Private Copy
R. T. Leupel
8/3/10

TOMO I FACICULO II

MEMORIAS

DO

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RIO DE JANEIRO — MANGUINHOS

AGOSTO DE 1909

(Publicado em Dezembro)

SUMARIO:

Pag.

I — Dr. S. von PROWAZEK — **Contribuição para o estudo do dezenvolvimento do "Spirochaeta gallinarum"** (7 figuras no texto) 79

II — Dr. ALCIDES GODOY — **Multiplicação dos bacterios em cultura.** I. Constante de velocidade de multiplicação 81

III — Dr. GOMES DE FARIA — **Echinostomum crotophagae, n. sp.** Novo parazito do anú azul, Crotophaga maior. L. (Estampa 5) 99

IV — Dr. S. von PROWAZEK — **Duplicidade morfolojica nos infuzorios ciliados** (Estampa 6) 105

V — Dr. ARTHUR MOSES — **Da pesquiza de antijeno e de anticorpo pela fixação de complemento** . . 109

VI — Dr. ADOLPHO LUTZ — **Contribuição para o conhecimento das especies brazileiras do genero "Simulium"** 124

VII — Drs. S. von PROWAZEK e H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Estudos sobre a variola** (2 figuras no texto e estampas 7 e 8) 147

VIII — Dr. CARLOS CHAGAS — **Nova tripanozomiaze humana.** Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem (10 figuras no texto e estampas 9—13) 159

SOMMAIRE:

I — Dr. S. von PROWAZEK — **Zur Entwicklung von "Spirochaeta gallinarum"** (7 Text-Figuren) . . 79

II — Dr. ALCIDES GODOY — **Ueber die Vermehrung der Bacterien in den Culturen.** I. Die Constante ihrer Geschwindigkeit 81

III — Dr. GOMES DE FARIA — **Echinostomum crotophagae, n. sp.** A new parasite of the blue anú, Crotophaga maior. L. (With plate 5) 99

IV — Dr. S. von PROWAZEK — **Formodimorphismus bei ciliaten Infusorien** (Tafel 6) 105

V — Dr. ARTHUR MOSES — **Ueber den Nachweis von Antigen und Antikörper durch Komplementablenkung** 109

VI — Dr. ADOLPHO LUTZ — **Beitrag zur Kenntniss der brasilianischen Simuliumarten.** 124

VII — Drs. S. von PROWAZEK und H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Variola-Untersuchungen.** (2 Text-Figuren und Tafel 7 und 8). 147

VIII — Dr. CARLOS CHAGAS — **Ueber eine neue Trypanosomiasis des Menschen.** Studien über Morphologie und Entwicklungszyklus des *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, Erreger einer neuen Krankheit des Menschen (10 Text-Figuren und Tafel 9—13) 159

AVIZO As «MEMORIAS» serão publicadas em faciculos, que não aparecerão em datas fixas e que formarão volumes de mais ou menos 200 pajinas. No minimo, aparecerá um volume por ano.

Na parte escrita em portuguez foi adotada a grafia aconselhada pela Academia de Letras do Rio de Janeiro.

Toda correspondencia relativa ás «MEMORIAS» deverá ser dirijida ao **"Diretor do Instituto Oswaldo Cruz - Caixa postal 926 - Manguinhos - Rio de Janeiro".**

AVIS Les «MEMOIRES» seront publiés par fascicules qui ne paraitront pas en epoques determinées et qui formeront des volumes d'à peu près 200 pages. Il paraitra chaque année, au moins, un volume.

La partie portugaise est écrite selon la graphie adoptée par l'Académie de Lettres de Rio de Janeiro.

Toute correspondance doit être adressée au **"Directeur de l'Institut Oswaldo Cruz — Caisse postale 926 - Manguinhos - Rio de Janeiro".**

Contribuição para o estudo do dezenvolvimento do "Spirochaeta Gallinarum"

pelo

Dr. S. von Prowazek.

(Com 7 figuras no texto)

Zur Entwicklung von "Spirochaeta Gallinarum"

von

Dr. S. von Prowazek.

(Mit 7 Abbildungen im Text)

Durante minha permanencia, por muitos mezes, em Manguinhos pesquizei, quazi que diariamente, de Outubro de 1908 a Janeiro de 1909 carrapatos *(Argas miniatus Koch)* infetados com o *Spirochæta gallinarum,* em preparados coloridos pelo processo de *Loeffler* e pude verificar o seguinte:

As mais das vezes no fim do 3.º dia, apoz a infeção aparecem os primeiros *spirochaetæ* no lacunoma do carrapato; para isto verificar basta incizar cuidadozamente com tezoura fina uma das pernas do argas e, assim, seguramente se encontram no liquido turvo, rico de leucócitos, da cavidade geral, espiroquetas cujo numero aumenta mais tarde.

No lacunoma tem lugar uma *evolução* da qual poderão ser observados os seguintes estádios:

1.º Espiroquetas que se acham apostos aos leucócitos e, em parte, tambem, alguns no interior delles.

2.º *Estádios de multiplicação* dos espiroquetas (Fig. 1, no 3.º dia; Fig. 2, no 7.º dia; Fig. 3, no 28.º dia, etc.). Na Fig. 1, vè-se ainda entre as duas metades fendidas do corpo do espiroqueta, o periplasto distendido sob a fórma de membrana. Mais tarde, os espiroquetas tornam-se muito delgados e com espiras estreitas (Fig. 5). O estádio de multiplicação figurado no dezenho 5 e que

Während meines mehrmonatlichen Aufenthaltes in Manguinhos untersuchte ich vom Oktober bis Januar 1909 fast täglich nach *Löffler* gefärbte Ausstriche von mit *Spirochaeta gallinarum* infizierten Zecken (*Argas miniatus Koch*) und konnte folgendes feststellen:

Zumeist am 3. Tage nach der Infektion treten die ersten Spirochaeten im Lakunom der Zecke auf; man braucht nur vorsichtig ein Bein der Zecke mit einer kleinen Scheere anzuschneiden und ist sicher, in der trüben leukocytenhaltigen Leibeshöhlenflüssigkeit bereits Spirochaeten zu finden, deren Zahl später zunimmt.

Im Lakunom findet eine *Entwicklung* statt und man kann folgende Stadien beobachten:

1) Spirochaeten, die den Leukocyten anliegen, zum Teil kann man sie auch im Innern der Leukocytenzellen nachweisen.

2) *Vermehrungszustände* der Spirochaeten. (Fig. 1 am 3. Tage, Fig. 2 am 7. Tage, Fig. 3 am 28. Tage etc.). In Fig. 1 sieht man zwischen den beiden Spalthälften des Spirochaetenleibes noch den hautartig ausgezogenen Peripalast. In der Folgezeit werden die Spirochaeten sehr *zart* und *enggewunden* (Fig. 5). Das Vermehrungsstadium der Fig. 5, das aus dem Lakunom der Zecke 48 Tage nach der Infektion stammt, kann man als *mul-*

provém do lacunoma dum argas, com 48 dias de infeção, póde ser interpretado como um estádio de *repetidas* divizões lonjitudinais, no qual os individuos orijinados dessa divizão sucessiva se desdobram como os decimetros dum desses metros articulados uzados pelos carpinteiros.

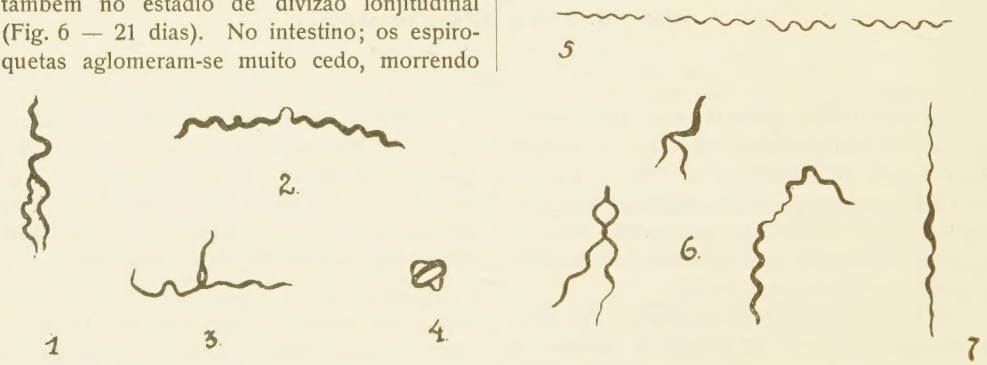
3.º Na cavidade do corpo, encontram-se, tambem, fórmas enroladas de espiroquetas (Fig. 4).

Examinando as glandulas salivares izoladas verifiquei a existencia dos primeiros espiroquetas no fim de 14 dias. Aí se acham tambem no estádio de divizão lonjitudinal (Fig. 6 — 21 dias). No intestino; os espiroquetas aglomeram-se muito cedo, morrendo

tiples Längsteilungsstadium auffassen, indem sukzessive die einzelnen Teilindividuen sich auseinanderlegten wie die Dezimeterteile eines zusammenlegbaren Zimmermannmetermasses.

3) Kommen in der Leibeshöhle auch *eingerollte* Spirochaetenformen vor Fig. 4).

In der herauspräparierten Speicheldrüse wurden von mir die ersten Spirochaeten nach 14 Tagen gefunden. Es kommen hier auch Längsteilungsstadien vor (Fig. 6, 21 Tage). Im Darm agglomerieren die Spirochaeten frühzeitig und die Hauptmasse geht wohl zu Grunde.



provavelmente a maioria delles. Aí encontram-se mais tarde fórmas empalidecidas, ou filamentos que *aprezentam intumecencias* do corpo celular, emquanto que o periplasto ainda é vizivel, sob a fórma de fio delgado e ondulozo. (Fig. 7).

Nos ovos dos argas não foram encontrados espiroquetas. Destas pesquizas rezulta que o *Spirochæta gallinarum* efetua um ciclo evolutivo (multiplicação, divizão multipla, fórmas delgadas, estádio de repouzo) que se processa em certo espaço de tempo e que, em consequencia disto, é encontrado no lacunoma intato (mais ou menos depois do 3.º dia) e nas glandulas salivares (mais ou menos no 14.º dia).

O carrapato é efetivamente o *hospedeiro intermediario* do *Spirochæta* e não simples transmissor passivo, como ultimamente, por varios, tem sido considerado.

Man findet hier später abgeblasste Formen oder Spirochaetenfäden, deren Zellleib lokal *Anschwellungen besitzt*, während der Periplast als ein zarter, gewellter Faden noch vorhanden ist. (Fig. 7).

In den Eiern wurden keine Spirochaeten gefunden. Aus den Untersuchungen geht hervor, dass *Spirochaeta gallinarum* in der Zecke eine über einen gewissen Zeitraum ausgedehnte Entwicklung (Vermehrung, multiple Teilung, zarte Formen, Ruhestadien) durchmacht und dass man demgemäss die Spirochaeten im unverletzten Lakunom (ca. nach 3 Tagen) und in der Speicheldrüse (ca. nach 14 Tagen) findet.

Die Zecke ist der *tatsächliche Zwischenwirt* der *Spirochaeta* und nicht etwa ein passiver Ueberträger, wie in der letzten Zeit von mehreren Seiten angenommen wird.

Multiplicação dos bacterios em cultura.

I. Constante de velocidade de multiplicação

pelo

Dr. Alcides Godoy,

Assistente do Instituto.

Ueber die Vermehrung der Bacterien in den Culturen.

I. Die Constante ihrer Geschwindigkeit

von

Dr. Alcides Godoy,

Assistenten des Instituts.

Sobre a relação existente entre o numero de bacterios e o tempo de vejetação num meio de cultura não são muitos os trabalhos experimentais.

NAEGELI, por meio de uma formula deduzia da quantidade de acido formado, em tempos conhecidos, por um bacterio zimojenico, a quantidade total de elementos que havia no liquido em fermentação; este metodo de avaliação é assaz interessante, especialmente por ser um processo indireto de pesquiza, para o julgamento dos rezultados obtidos por processo direto.

BUCHNER, LONGARD e RIEDLIN, partindo da idéa aprioristica que, sendo a segmentação dos bacterios a divizão transversal, rezultando 2 unidades de cada celula preexistente, conclue d'aí que conhecido o numero de bacterios semeados (a), e os existentes no fim de certo tempo (b), se poderia determinar o numero de gerações (n) pela formula

$$n = \frac{\log.\ b - \log.\ a}{\log.\ 2}$$

conhecido o valor de *n,* o tempo necessario para a completa faze da vejetação a partir da divizão que orijinou a nova celula, até aquelle

Die experimentellen Arbeiten über die Beziehungen zwischen der Anzahl der Bacterien und ihrer Vegetationszeit in einem Kulturmedium sind keineswegs zahlreich. NAEGELI berechnete mit Hilfe einer Formel aus den, von einem Gährungsbacterium in bekannten Zeiträumen gebildeten, Säuremengen die Totalanzahl der in der Gährungsflüssigkeit vorhandenen Individuen; diese Schätzungsmethode ist, gerade weil es sich um eine indirecte Untersuchungsmethode handelt, von bedeutendem Interesse für die Beurteilung der durch einen directen Prozess gewonnenen Resultate.

BUCHNER, LONGARD und RIEDLIN gingen von der aprioristischen Idee aus, dass die Teilung der Bacterien eine transversale ist und aus jeder ursprünglichen Zelle zwei Einheiten hervorgehen und schlossen daraus, dass, wenn die Anzahl der eingesäten Bacterien (a) und diejenige der nach einer bestimmten Zeit vorhandenen gegeben ist, man die Anzahl der Generationen aus folgender Formel bestimmen könne.

$$n = \frac{\text{Log. b} - \text{Log. a}}{\text{Log. 2}}$$

em que esta por sua vez, se desdobra, seria o quociente do numero de minutos decorridos na experiencia pelo numero *n* de gerações formadas. Os autores não provam a exatidão da formula pela avaliação do numero de microbios em tempos diversos; só fazem duas determinações, a da quantidade semeada e a correspondente a certo tempo de vejetação. Julgam os autores que, sendo o tempo de duração da experiencia apenas de algumas horas a influencia da diminuição de alimentos não se fará sentir na velocidade da multiplicação.

Este modo de considerar a multiplicação dos bacterios é demaziado elementar e simples, contrario ás leis de formação na natureza. Já RAULIN, em 1867, havia demonstrado que existe uma relação numerica constante entre o pezo do vejetal formado e o da substancia nutritiva dezaparecida do meio de cultura.

Funcionalmente podemos considerar as celulas, como porções limitadas de uma substancia — substancia de natureza quimica ainda desconhecida — possuindo a propriedade de aumentar de massa, desde que se lhe forneçam: os compostos quimicos necessarios a essa sinteze, a energia preciza e condições favoraveis de meio. Seria a substancia viva, como que uma especie de catalizador capaz de aumentar a massa pela sua propria ação.

Na cultura dos microbios a equação da *vida elementar manifestada*

$$a + q = \lambda a + R$$

deverá encontrar a sua mais clara aplicação. Como se sabe, nesta equação, *a* reprezenta a substancia viva, *q* os alimentos, λ um coeficiente maior que a unidade, e R os reziduos da assimilação.

Rezulta disto que a quantidade de substancia *a* formada é função de *q*, cazo o coeficiente λ não venha ainda por seu valor ser novo elemento para o calculo. No cazo especial dos bacterios e nos meios de cultura de compozição não completamente determinada, a avaliação direta de *q* é impossivel,

Wenn der Wert von n bekannt ist, so wäre die Zeit für die ganze Vegetationsphase, vom Momente der Teilung, welche die neue Zelle lieferte, bis zu dem, in welchem diese sich wiederum teilt, gleich dem Quotienten aus der Anzahl der verflossenen Minuten und der Zahl *n* der gebildeten Generationen. Die Autoren geben keinen Beweis der Richtigkeit ihrer Formel durch Schätzung der Keimzahl zu verschiedenen Zeiten, sondern machen nur zwei Bestimmungen, diejenige der eingesäten Menge und eine solche, die einer bestimmten Vegetationszeit entspricht. Sie sind der Ansicht, dass, bei einer Versuchsdauer von nur einigen Stunden, der Einfluss der Verminderung der Nährstoffe auf die Vermehrungsgeschwindigkeit nicht bemerkbar werde.

Diese Auffassungsweise der Bacterienvermehrung ist allzu elementar und im Widerspruch zu den Bildungsgesetzen in der Natur. Schon RAULIN hat 1867 nachgewiesen, dass zwischen dem Gewichte des gebildeten Pflanzengewebes und der aus dem Nährmedium verschwundenen Nährsubstanz ein constantes Zahlenverhältniss besteht.

Functionell können die Zellen als begrenzte Teile einer — ihrer chemischen Natur nach unbekannten — Substanz aufgefasst werden, welche die Fähigkeit besitzen, an Masse zuzunehmen, sobald ihnen die zu dieser Synthese nötigen chemischen Verbindungen, die notwendige Energie und günstige Bedingungen des Mediums geboten werden. Es stellt somit die lebende Substanz eine Art Katalysator dar, der im Stande ist, seine Masse durch seine eigene Tätigkeit zu vermehren.

Bei der Kultur der Microben sollte die Gleichung der *elementaren Lebensäusserung*

$$a + q = \lambda a + R$$

ihre deutlichste Anwendung finden. Wie bekannt, bedeutet a die lebende Substanz, q die Nährstoffe, λ einen Coefficienten, der grösser ist, als die Einheit und R die Residuen der Assimilation.

Es folgt daraus, dass die gebildete Quantität der Substanz a eine Function von q ist, falls nicht der Coefficient λ durch seinen Wert ein neues Element in der Rechnung bildet.

porem a quantidade de *a* póde ser determinada pelo numero de unidades formadas. As quantidades de bacterios formados e de alimentos existentes são inversas, isto é essencial ao modo de interpretar a experiencia que segue e as concluzões que della decorrem.

Procurámos indicar com precizão as condições de experiencia. Evitámos as cauzas capazes de obscurecer o fenomeno, regularizando as necessarias e eliminando as nocivas. As medidas de volume, assim como as de temperatura comportam exatidão superior a 1 % e, na avaliação final das colonias de cada observação o erro não excede 4 %.

Interpretados os rezultados desta experiencia, de acordo com o modo de ação das massas quimicas, segundo a lei de GULDBERG e WAAGE, torna-se claro que a transformação dos alimentos, num meio nutritivo, em substancia viva — e, por conseguinte a formação de nóvas celulas — se faz pelo processo geral das ações quimicas. E', pois, calculavel em limites de tempo em que o coeficiente λ pelo seu valor não altera completamente a marcha da reação, pela formula das reações monomoleculares:

$$\frac{-dt}{-dx} = C\,k$$

O valor de *k*, constante de velocidade de reação é determinado com tal aproximação que põe fóra de duvida a aplicabilidade da formula.

Para verificarmos experimentalmente a concepção expendida procurámos estudar a multiplicação do bacilo tifico em um caldo de carne peptonizado a 1 %, para o que adotámos a seguinte tecnica.

Tecnica. — A cerca de 10 c. c. de caldo adicionámos, de uma cultura de 12 horas, em caldo da mesma fabricação, a quantidade necessaria para se obter uma lijeira turvação; lijeira, porem bem nitida. Desta primeira diluição adicionámos 0,05 c. c. a segundo tubo com egual quantidade do mesmo caldo; da diluição assim preparada retirámos 0,05 c. c. para terceiro tubo. Naturalmente, ajitavamos cuidadozamente a mistura de modo a se dar repartição unifórme dos germens

Im speciellen Falle der Bacterien und in Nährmedien von nicht genau definirter Zusammensetzung, ist die directe Schätzung von q unmöglich, dagegen kann die Quantität *a* aus der Zahl der gebildeten Einheiten bestimmt werden. Die Zahl der gebildeten Bacterien und die Menge der vorhandenen Nährstoffe verhalten sich umgekehrt, was für die Erklärung des nachstehenden Versuches und der daraus folgenden Schlüsse wesentlich ist.

Ich habe versucht, die Bedingungen des Versuches klar anzugeben und die Ursachen zu vermeiden, welche die Beobachtung zu trüben im Stande wären, indem ich die notwendigen Bedingungen regelte und die hinderlichen vermied. Die Messungen des Volumens und der Temperatur gestatten eine Genauigkeit, die mehr als ein Procent beträgt und bei der schliesslichen Schätzung der Colonien in jeder Beobachtung gehen die Irrtümer nicht über 4 % hinaus. Deutet man die Resultate dieses Versuches in Uebereinstimmung mit der Wirkungsweise der chemischen Massen nach dem Gesetz von GULDBERG und WAAGE, so geht deutlich daraus hervor, dass in einem Culturmedium die Umwandlung der Nährstoffe in lebende Substanz und dem entsprechend auch die Bildung neuer Zellen nach dem allgemeinen Process der chemischen Vorgänge stattfindet. Sie lässt sich also innerhalb von Zeitgrenzen, zwischen welchen der Coefficient durch seinen Wert den Ablauf des Vorganges nicht gänzlich verändert, aus der Formel der monomoleculären Reactionen

$$\frac{-dt}{-dx} = C\,k$$

berechnen. Der Wert von k, der Constanten der Geschwindigkeit der Reaction, lässt sich mit einer derartigen Annäherung bestimmen, das die Anwendbarkeit der Formel nicht zu bezweifeln ist.

Um die auseinandergesetzte Auffassung experimentell zu controlliren, versuchte ich, die Vermehrung des Typhusbacillus in Nährbouillon mit 1 % Pepton zu studiren, wobei ich mich folgender Technik bediente:

Technik. Zu ca. 10 c. c. Nährbouillon wurden von einer zwölfstündigen, in Bouillon

no caldo. Da ultima diluição assim obtida, retirámos com pipeta normal, 1,00 c. c. que colocavamos em tantos tubos quantas as observações que pretendiamos fazer. Os tubos de ensaio que empregámos eram de vidro rezistente de Ehrhardt e Metzger de Darmstadt, (R-Glas), e submetidos a ação do vapor d'agua como indica ABEGG, e em seguida, depois de esgotados e secos eram fechados com rolha de borracha esterilizada pela ebulição e seca. Os tubos eram, então, levados a um termostato modelo OSTWALD, previamente regulado para a temperatura maxima provavel do dia da experiencia, 27,0 gráos centigrados; a agua era mantida em contante ajitação por meio de turbina. A temperatura da agua ocilava em limites de 0,05 de gráo. A temperatura do exterior era, na ocazião da colocação dos tubos no termostato, de 26º, e pouco decreceu no decurso dos 105 minutos que durou a experiencia. Os tubos, apezar disto, permaneceram sempre no termostato e somente ficaram á temperatura do laboratorio o tempo estritamente necessario para nelles se colocar o agar e derramal-o em placas. Depois de feita a I observação — tempo 0 — analoga ás adiante descritas, retiravamos, de 15 em 15 minutos, um tubo ao qual adicionavamos 10 c. c. de agar fundido e esfriado a 44º. O tubo era ajitado 5 vezes por movimento de bascula, para egual repartição dos microbios; o agar era então derramado em placas de Petri. Com cada tubo faziamos 2 placas: a 1.ª, na qual havia uma camada de agar que se gelificára, estando a placa imovel, de modo a formar superficie horizontal, recebia o agar semeado. Esta 1.ª placa recebia a quazi totalidade dos germens. No tubo com o qual se tinha preparado a 1.ª placa derramava-se nova porção de agar fundido e esfriado a 44º, destinado a acarretar os microbios existentes na porção restante de agar aderente as paredes do tubo. Com esta nova porção de agar preparava-se a 2.ª placa pelo processo habitual.

As placas assim feitas apoz completa gelificação — cerca de 10 minutos — eram levadas para estufa regulada a 37º. No in-

derselben Herstelluug gemachten, Kultur soviel zugesetzt, als nöthig war, um eine leichte, aber deutliche, Trübung zu erzielen. Von dieser ersten Verdünnung wurden 0,05 cc. einem Tubus zugesetzt, der eine gleiche Quantität der gleichen Nährflüssigkeit enthielt; von der so hergestellten Verdünnung entnahm ich 0,05 cc. für einen dritten Tubus. Natürlich wurden die Mischungen sorgfältig geschüttelt, um eine gleichmässige Verteilung der Keime in der Bouillon zu erzielen. Von der letzten so hergestellten Verdünnung entnahm ich mit einer Normalpipette je 1 cc. für so viele Tuben, als ich zu den Beobachtungen gebrauchte. Die verwendeten Reagenzgläschen waren aus R.-Glas von EHRHARDT und METZGER in Darmstadt und wurden nach der Angabe von ABEGG mit Wasserdampf behandelt und nach dem Trocknen mit einem, durch Auskochen sterilisirten, trockenen Gummipfropfe verschlossen. Die Röhrchen wurden hierauf in einen Thermostaten von OSTWALD gebracht, der zuvor für die wahrscheinliche Maximaltemperatur des Versuchstages, 27° Centigrade, regulirt war, wobei das Wasser durch eine Turbine in beständiger Bewegung erhalten wurde. Die Wärme des Wassers schwankte innerhalb einer Grenze von 0,05 Graden, während die Aussentemperatur 26° betrug, als die Röhrchen in den Thermostaten gebracht wurden und während der 105 Minuten, welche der Versuch dauerte, nur wenig abnahm. Uebrigens blieben die Tuben doch immer im Thermostaten und wurden der Laboratoriumstemperatur nur so lange ausgesetzt, als für den Zusatz von Agar und das Giessen von Platten unbedingt nötig war. Nachdem die erste Beobachtung (Zeit = Null) nach Art der unten beschriebenen gemacht war, entnahm ich von 15 zu 15 Minuten ein Röhrchen, dem ich 10 cc. geschmolzenen und auf 44° abgekühlten Agars zusetzte. Dasselbe wurde fünf mal durch Schaukelbewegung geschüttelt, um eine gleichmässige Verteilung der Microbien zu erzielen und der Agar darauf in Petrischalen ausgegossen. Mit jedem Tubus machte ich zwei Platten; die erste enthielt eine Agarschicht, welche ohne Bewegung der Platte erstarrt war, sodass sie eine horizontale Oberfläche darbot

terior desta o ar não era artificialmente humidecido, o que, favorecendo a dessecação do meio nutritivo evitava um crecimento exajerado e a confluencia das colonias superficiais. As placas ficavam na estufa, cobertas apenas com o papel de filtro que tinha sido colocado na face interna da tampa, antes da esterilização.

Depois de 24 horas de estufa eram as placas d'aí retiradas e contadas as colonias. A contajem se fazia em aparelho por nos idéado e que oferece a vantajem da vizão simultanea, em mesmo plano das colonias e das divizões de escala semelhante a de BUERKER, para contajem de globulos sanguineos, porem 21,5 vezes maior. Sob cada placa traçavamos dois diametros perpendiculares, limitando, assim, os quadrantes, e contavamos em cada quadrante a superficie de 4,622 cm.² — 4 series horizontais de quadrados formam um quadrado grande, correspondente á superficie acima indicada. — Depois, contavamos sobre as linhas limitadoras outras tantas unidades de superficie. Obtinhamos assim 8 series de contajens. Cada serie é, na experiencia, reprezentada pela soma de 4 parcelas formadas pelo numero de colonias contidas nas series horizontais de pequenos quadrados. Nossa unidade de superficie é $^1/_9$ da escala de BUERKER aumentada 21,5 vezes.

Todas as colonias dezenvolvidas na 2.ª placa eram contadas diretamente, sem recorrer ao aparelho, marcando-se o lugar de cada colonia com um ponto de tinta, o que póde sempre ser feito visto como, nessa placa, o numero de colonias é sempre pequeno. Contadas as 8 series da 1.ª placa, somam-se os seus valores para determinação do valor medio da serie. Determina-se a diferença que cada serie faz com esse valor medio; somam-se estas diferenças depois de elevadas ao quadrado. Dividindo-se o numero obtido por 56, a sua raiz quadrada dá o erro provavel para cada serie; isto, segundo a conhecida formula

$$F = \pm \sqrt{\Sigma d^2/n\,(n-1)}$$

und wurde mit dem besäten Agar beschickt; sie enthielt nahezu die gesamte Menge der Keime. In das Röhrchen, welches zur Herstellung der ersten Platte gedient hatte, wurde eine neue Portion geschmolzenen und auf 44° abgekühlten Agars eingegossen, um die — in der noch zurückgebliebenen, den Wänden des Tubus anhaftenden, Agarmenge vorhandenen — Keime herauszuspülen; mit dieser neuen Agarportion wurde die zweite Platte auf gewöhnliche Weise angefertigt. Die so hergestellten Platten wurden nach vollständiger Gerinnung, d. h. nach ca. 10 Minuten, in einen auf 37° regulirten Brütschrank gebracht; die Luft im Innern des Letzteren war nicht künstlich feucht gemacht, sodass durch Begünstigung der Austrocknung des Nährbodens ein übertriebenes Wachstum und ein Zusammenfliessen der oberflächlichen Colonien vermieden wurde. Die Platten blieben im Brütschrank nur mit dem Filtrirpapier bedeckt, welches vor der Sterilisirung in die Innenseite des Deckels eingelegt worden war.

Nach 24 Stunden wurden die Platten aus dem Brütschranke entnommen und die Colonien gezählt. Die Zählung geschah mit Hilfe eines von mir ersonnenen Apparates, welcher den Vorzug bietet, dass man gleichzeitig in einer Ebene die Colonien und die Abteilungen einer Scala erblickt. Letztere gleicht derjenigen von BÜRKER für die Zählung der Blutkörperchen, jedoch 21,5 mal grösser. Auf jeder Platte zeichnete ich zwei senkrechte Diameter und zählte auf jedem der so entstandenen Quadranten die Oberfläche von 4,622 Quadratcentimeter, was einem grossen, aus 4 horizontalen Serien kleiner Quadrate gebildeten, Vierecke entspricht. Dann zählte ich auf den Begrenzungslinien ebensoviele Oberflächeneinheiten und erhielt so acht Zählungsreihen. Jede Serie ist in dem Versuche durch die Summe von vier Zahlen vertreten, welche jeweilen der Anzahl der, in den Horizontalreihen von kleinen Quadraten enthaltenen, Colonien entsprechen. Meine Oberflächeneinheit ist gleich einer 21,5-fachen Vergrösserung des neunten Teiles einer Bürkerschen Scala.

Alle in der zweiten Platte entwickelten Colonien wurden direct gezählt, indem der

Determinado assim o valor medio de cada serie e seu erro medio provavel, são elles multiplicados pelo quociente da area da placa, pela superficie contada, em cada serie. Este produto reprezenta o numero total de colonias da 1.ª placa e seu erro medio provavel. Adicionado á esse valor o numero de colonias encontradas na segunda placa, tinhamos o numero total de microbios existentes em cada tubo, na ocazião de se fazer nelle a adição de agar.

Fizemos as 8 observações seguintes:

Ort jeder Colonie durch einen Tintenpunkt markirt wurde, was vollständig genügt, da die Anzahl der Colonien auf dieser Platte immer eine geringe ist. Nachdem die acht Serien der ersten Platten gezählt sind, summirt man die Beträge, um den Mittelwert der Serie zu bestimmen. Für jede Serie bestimmt man den Unterschied von disem Mittelwerte und summirt diese Differenzen, nachdem man sie ins Quadrat erhoben hat. Wenn man die Summe durch 56 dividirt, so ergiebt ihre Quadratwurzel den wahrscheinlichen Durchschnittsirrtum für jede Serie nach der bekannten Formel:

$$F = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n\,(n-1)}}$$

Wenn so für jede Serie der Durchschnittswert und der wahrscheinliche Durchschnittsfehler bestimmt ist, wird er in jeder Serie mit den Quotienten aus der Oberfläche der Platte und der gezählten Oberfläche multiplicirt; das Product ergibt die Gesamtzahl der Colonien der ersten Platte und den wahrscheinlichen Durchschnittsfehler. Durch Addition dieses Wertes zu der Gesamtzahl der auf der zweiten Platte gefundenen Colonien erhielt ich die Gesamtzahl der Keime, welche in jedem Röhrchen vorhanden waren, als ihm der Agar zugesetzt wurde.

Ich machte die acht folgenden Beobachtungen:

I Observação

(0 minutos)

Area da 1.ª placa = 63,61 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
23	32	29	36	26	34	36	25
25	44	29	26	26	34	28	29
29	22	39	29	28	31	24	23
25	25	27	28	33	36	23	27
102	123	124	119	113	135	111	104

Series	Somas	d	d²
1	102	14	196
2	123	7	49
3	124	8	64
4	119	3	9
5	113	3	9
6	135	19	361
7	111	5	25
8	104	12	144
	931		857

$$\text{Media das series} = \frac{931}{8} = 116$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{857}{56}} = \pm 4$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$116 \pm 4 \,.\, 13{,}76 = 1596 \pm 56$$

1.ª placa = ... 1596 ± 56
2.ª » = ... 47
Total I e erro medio = . 1643 ± 56

Beobachtung I

(0 Minuten)

Flächeninhalt der Platte = 63,61 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
23	32	29	36	26	34	36	25
25	44	29	26	26	34	28	29
29	22	39	29	28	31	24	23
25	25	27	28	33	36	23	27
102	123	124	119	113	135	111	104

Serien	Summen	d	d²
1	102	14	196
2	123	7	49
3	124	8	64
4	119	3	9
5	113	3	9
6	135	19	361
7	111	5	25
8	104	12	144
	931		957

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{931}{8} = 116$$

$$\text{Durchschnittsfehler} = \pm\sqrt{\frac{857}{56}} = \pm 4$$

Total und Durchschnittsfehler Erste Platte

$$116 \pm 4 \,.\, 13{,}76 = 1596 \pm 56$$

Erste Platte = ... 1596 ± 56
Zweite Platte = ... 47
Total von I und Durchschnittsfehler = . . . 1643 ± 56

II Observação

(15 minutos)

Area da 1.ª placa = 66,47 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4.622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
35	37	34	24	28	31	28	29
25	36	32	25	26	41	29	23
32	25	25	36	19	22	28	37
29	31	25	32	30	26	27	31
121	129	116	117	103	120	112	120

Series	Somas	d	d²
1	121	4	16
2	129	12	144
3	116	1	1
4	117	0	0
5	103	14	196
6	120	3	9
7	112	5	25
8	120	3	9
	938		400

$$\text{Media das series} = \frac{938}{8} = 117$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{400}{56}} = \pm 3$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$117 \pm 3 \,.\, 14{,}38 = 1682 \pm 43$$

1.ª placa = ...	1682 ± 43
2.ª placa = ...	41
Total II e erro medio = .	1723 ± 43

Beobachtung II

(15 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 66,47 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
35	37	34	24	28	31	28	29
25	36	32	25	26	41	29	23
32	25	25	36	19	22	28	37
29	31	25	32	30	26	27	31
121	129	116	117	103	120	113	120

Serien	Summen	d	d²
1	121	4	16
2	129	12	144
3	116	1	1
4	117	10	190
5	103	14	196
6	120	3	9
7	112	5	25
8	120	3	9
	938		400

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{933}{8} = 117$$

$$\text{Durchschnittsfehler des Mittels} = \pm\sqrt{\frac{400}{56}} = \pm 3$$

Total und Durchschnittsfehler Zweite Platte

$$117 \pm 3 \,.\, 14{,}38 = 1632 \pm 43$$

Erste Platte = ...	1682 ± 43
Zweite Platte = ...	41
Total von II und Durchschnittsfehler = . . .	1723 ± 43

III Observação

(30 minutos)

Area da 1.ª placa = 59,44 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
33	30	32	40	26	44	39	27
22	35	42	41	26	38	40	33
34	28	26	43	33	37	31	32
39	44	32	37	33	39	30	40
128	137	132	151	118	158	140	152

Series	Somas	d	d²
1	128	11	121
2	137	2	4
3	132	7	49
4	151	12	144
5	118	21	441
6	158	19	261
7	140	1	1
8	152	13	169
	1116		1290

$$\text{Media das series} = \frac{1116}{8} = 139$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{1296}{56}} = \pm 5$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$139 \pm 5 \,.\, 12{,}86 = 1787 \pm 64$$

1.ª placa = ... 1787 ± 64
2.ª placa = ... 83
Total III e erro medio = . 1870 ± 64

Beobachtung III

(30 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 59,44 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
33	30	32	40	26	44	39	27
22	35	42	41	26	38	40	33
34	28	26	40	33	37	31	32
39	44	32	37	33	39	30	40
128	137	132	151	118	158	140	152

Serien	Summen	d	d²
1	128	11	121
2	137	2	4
3	132	7	49
4	151	12	144
5	118	21	441
6	158	39	361
7	140	1	1
8	152	13	169
	1116		1290

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{1116}{8} = 139$$

Durchschnittsfehler des Mittels =

$$= \pm\sqrt{\frac{1396}{56}} = \pm 5$$

Total und Durchschnittsfehler Dritte Platte

$$139 \pm 5 \,.\, 12{,}86 = 1787 \pm 64$$

Erste Platte = ... 1787 ± 64
Zweite Platte = ... 83
Total von III und Durchschnittsfehler . . . . 1870 ± 64

IV Observação

(45 minutos)

Area da 1.ª placa = 62,21 cm.².
Superficie contade em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
28	25	40	37	38	41	35	46
33	33	26	31	29	40	38	37
30	37	36	37	41	35	32	39
42	34	39	36	35	32	22	40
133	129	141	141	143	148	127	162

Series	Somas	d	d²
1	133	7	49
2	129	11	121
3	141	1	1
4	141	1	1
5	143	3	9
6	148	8	64
7	127	13	169
8	162	22	484
	1124		898

$$\text{Media das series} = \frac{1124}{8} = 140$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{898}{56}} = \pm 4$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$140 \pm 4 \,.\, 13{,}46 = 1884 \pm 54$$

1.ª placa = ... 1884 ± 54
2.ª placa = ... 87
Total IV e erro medio = . 1971 ± 54

Beobachtung IV

(45 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 62,21 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
28	25	40	37	38	41	35	46
33	33	26	31	29	40	38	37
30	37	36	37	41	35	32	39
42	34	39	36	35	32	22	40
133	129	141	141	143	148	127	162

Serien	Summen	d	d²
1	133	7	49
2	129	11	121
3	141	1	1
4	141	1	1
5	143	3	9
6	148	8	64
7	127	13	169
8	162	22	484
	1124		898

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{1124}{8} = 140$$

Durchschnittsfehler des Mittels =

$$= + \sqrt{\frac{898}{56}} = \pm 4$$

Total und Durchschnittsfehler Erste Platte

$$140 \pm 4 \,.\, 13{,}46 = 1884 \pm 54$$

Erste Platte = ... 1884 ± 54
Zweite Platte = ... 87
Total von IV und Durchschnittsfehler . . . . 1971 ± 54

V Observação

(60 minutos)

Area da 1.ª placa = 63,6 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
32	33	33	46	27	38	40	40
31	28	37	36	29	40	30	45
36	35	38	32	34	38	39	26
36	42	41	32	30	37	42	34
135	138	149	146	120	153	151	145

Series	Somas	d	d²
1	135	7	49
2	138	4	16
3	149	7	49
4	146	4	16
5	120	22	484
6	153	11	121
7	151	9	81
8	145	3	9
	1137		825

$$\text{Media das series} = \frac{1137}{8} = 142$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{825}{56}} = \pm 4$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$142 \pm 4 \,.\, 13{,}76 = 1954 \pm 55$$

1.ª placa = ... 1954 ± 55
2.ª placa = ... 92
Total V e erro medio = . 2036 ± 55

Beobachtung V

(60 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 63,61 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
32	33	33	46	27	18	40	40
31	28	37	36	29	40	30	45
36	35	38	32	34	38	39	26
36	42	41	32	30	37	42	34
135	138	149	146	120	153	151	145

Serien	Summen	d	d²
1	135	7	49
2	138	4	16
3	149	7	49
4	146	4	16
5	120	22	484
6	153	11	121
7	151	9	81
8	145	3	9
	1137		825

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{1137}{8} = 142$$

Durchschnittsfehler des Mittels =

$$= \pm\sqrt{\frac{825}{56}} = \pm 4$$

Total und Durchschnittsfehler Erste Platte

$$142 \pm 4 \,.\, 13{,}76 = 1954 \pm 55$$

Erste Platte = ... 1954 ± 55
Zweite Platte = ... 82
Total von V und Durchschnittsfehler = . . . 2036 ± 55

VI Observação

(75 minutos)

Area da 1.ª placa = 65,03 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
40	30	39	30	51	34	38	23
42	37	33	36	36	40	33	43
33	42	31	30	34	36	41	27
28	32	35	30	36	39	48	40
143	141	138	136	157	149	150	133

Series	Somas	d	d²
1	143	0	0
2	141	2	4
3	138	5	25
4	136	7	49
5	157	14	196
6	149	6	36
7	150	7	49
8	133	10	100
	1147		459

$$\text{Media das series} = \frac{1147}{8} = 143$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{459}{56}} = \pm 3$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$143 \pm 3 \,.\, 14{,}07 = 2011 \pm 42$$

1.ª placa = ... 2011 ± 42
2.ª placa = ... 90
Total VI e erro medio = . 2101 ± 42

Beobachtung VI

(75 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 65,03 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
40	30	39	30	51	34	38	23
42	37	33	36	36	40	33	43
33	42	31	30	34	36	31	27
28	32	35	30	36	39	48	40
143	141	138	136	157	149	150	133

Serien	Summen	d	d²
1	143	0	0
2	241	2	4
3	138	5	25
4	136	7	49
5	157	14	196
6	149	6	16
7	150	7	49
8	133	10	100
	1147		459

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{1147}{8} = 143$$

$$\text{Durchschnittsfehler des Mittels} = \pm\sqrt{\frac{459}{56}} = \pm 3$$

Total und Durchschnittsfehler Erste Platte

$$143 \pm 3 \,.\, 14{,}07 = 2011 \pm 42$$

Erste Platte = ... 2011 + 42
Zweite Platte = ... 90
Total von VI und Durchschnittsfehler = . . . 2101 ± 42

VII Observação

(90 minutos)

Area da 1.ª placa = 66,47 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
33	29	42	37	35	33	35	39
34	39	38	49	33	42	46	40
28	53	39	30	38	43	42	36
38	33	22	47	29	38	34	38
133	154	141	173	135	156	157	153

Series	Semas	d	d²
1	133	17	289
2	154	4	16
3	141	9	81
4	173	23	529
5	135	15	225
6	156	6	36
7	157	7	49
8	153	3	9
	1202		1234

$$\text{Media das series} = \frac{1202}{8} = 150$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm \sqrt{\frac{1234}{56}} = \pm 22$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$150 \pm 22 \,.\, 14{,}38 = 2157 \pm 316$$

1.ª placa = ... 2157 ± 316
2.ª placa = ... 98
Total VII e erro medio = . 2255 ± 316

Beobachtung VII

(90 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 66,47 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
33	29	42	37	35	33	35	39
34	39	38	49	33	42	46	40
28	53	39	30	38	43	42	36
38	33	22	47	29	38	34	38
133	154	141	173	135	156	157	153

Serien	Summen	d	d²
1	133	17	289
2	154	4	16
3	141	9	81
4	173	23	529
5	135	15	225
6	156	6	36
7	157	7	49
8	153	3	9
	1202		1234

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{1202}{8} = 150$$

Durchschnittsfehler des Mittels =

$$= \pm \sqrt{\frac{1234}{56}} = \pm 22$$

Total und Durchschnittsfehler Erste Platte

$$150 \pm 22 \,.\, 14{,}38 = 2157 \pm 316$$

Erste Platte = ... 2157 ± 316
Zweite Platte 98
Total von VII und Durchschnittsfehler = . . . 2255 ± 316

VIII Observação

(105 minutos)

Area da 1.ª placa = 63,61 cm.².
Superficie contada em cada serie = 4,622 cm.².

Contajem da Serie N.

1	2	3	4	5	6	7	8
39	35	43	35	39	35	22	41
45	33	34	41	39	46	44	38
38	42	51	33	41	40	41	43
33	47	39	40	36	40	41	37
155	157	167	149	155	161	148	159

Series	Somas	d	d^2
1	155	1	1
2	157	1	1
3	167	11	121
4	149	7	49
5	155	1	1
6	161	5	25
7	148	8	64
8	159	3	9
	1251		271

$$\text{Media das series} = \frac{1251}{8} = 156$$

$$\text{Erro medio da media} = \pm\sqrt{\frac{271}{56}} = \pm 2$$

Total e erro medio 1.ª placa

$$156 \pm 2 \,.\, 13{,}76 = 2147 \pm 27$$

1.ª placa = ... 2147 ± 27
2.ª placa 78
Total VIII e erro medio = 2225 ± 27

Beobachtung VIII

(105 Minuten)

Oberfläche der ersten Platte = 63,61 cm².
In jeder Serie gezählte Oberfläche = 4,622 cm².

Zählung der Serien N.

1	2	3	4	5	6	7	8
39	35	43	35	39	35	22	41
45	33	34	41	39	46	44	38
38	42	51	33	41	40	41	43
33	47	39	40	36	40	41	37
155	157	167	149	155	161	148	159

Serien	Summen	d	d^2
1	155	1	1
2	157	1	1
3	167	11	121
4	149	7	49
5	155	1	1
6	161	5	25
7	148	8	64
8	159	3	9
	1251		271

$$\text{Mittel der Serien} = \frac{1251}{8} = 156$$

Durchschnittsfehler des Mittels =

$$\pm\sqrt{\frac{271}{56}} \pm 2$$

Total und Durchschnittsfehler Erste Platte

$$156 \pm 2 \,.\, 13{,}76 = 2147 \pm 27$$

Erste Platte = ... 2147 ± 27
Zweite Platte = ... 78
Total von VIII und Durchschnittsfehler . . . 2225 ± 27

São estes os numeros totais de colonias e seu erro medio em cada observação, e, como é mais correto e traz simplificação ao calculo escrevemos sómente os 3 primeiros algarismos, separando por um ponto a caza dos milhares:

Observação	Total de colonias e erro provavel
I	1.64 ± 0.05
II	1.72 ± 0.04
III	1.87 ± 0.06
IV	1.97 ± 0.05
V	2.03 ± 0.05
VI	2.10 ± 0.04
VII	2.25 ± 0.316
VIII	2.22 ± 0.02

Dos valores acima podemos deduzir o numero de microbios formados durante as fazes da experiencia. A variação para mais ou para menos dos valores de cada observação, rezultante do erro de contajem, faz com que tenhamos, para cada observação, dois valores um maximo e um minimo:

Observação	max.	min.
I	1.69	1.59
II	1.76	1.68
III	1.93	1.81
IV	2.02	1.92
V	2.08	1.98
VI	2.14	2.06
VII	2.56	1.94
VIII	2.24	2.20

A quantidade de microbios será reprezentada pelo valor maximo, quando d'um valor maximo subtrairmos um minimo, ou por um valor minimo quando de um minimo subtrairmos um maximo.

Os numeros, rezultantes da subtração dos valores maximo ou minimo da observação VIII de um valor minimo ou maximo de uma outra observação, dão respetivamente o numero maximo ou minimo de bacterios, formados no tempo correspondente ao numero de minutos obtidos pela subtração do numero de 105, — tempo total da experiencia de minutos decorridos do inicio da experiencia, até a observação que se estuda. São

Dies sind die Totalzahlen der Colonien und ihr Durchschnittsfehler in jeder Beobachtung; da es richtiger ist und die Berechnungen vereinfacht, schreibe ich nur die drei ersten Zahlen, indem ich die Tausende durch einen Punkt abtrenne:

Beobachtung	Totalzahl der Colonien und wahrscheinlicher Fehler
I	1.64 ± 0,05
II	1.72 ± 0,05
III	1.87 ± 0.06
IV	1.97 ± 0,05
V	2.03 ± 0,05
VI	2.10 ± 0,04
VII	2.25 ± 0,31
VIII	2.22 ± 0.02

Von den obigen Werten kann man die Zahl der während der Versuchsphasen gebildeten Keime abziehen. Das Schwanken der Versuchsfehler - nach plus und minus macht, dass wir für jedes Experiment einen Maximal- und einen Minimalwert haben:

Beobachtung	Max.	Min.
I	1.69	1.79
II	1.66	1.58
III	1.93	1.81
IV	2.02	1.92
V	2.08	1.98
VI	2.14	2.06
VII	2.56	1.94
VIII	2.24	2.20

Die Anzahl der Keime wird durch einen Maximalwert repräsentirt, wenn wir von einem Maximalwert ein Minimum oder durch einen Minimalwert, wenn wir einem Minimum ein Maximum subtrahiren.

Die Zahlen, welche aus der Subtraction der Minimal- und Maximalwerte einer anderen Beobachtung von den Maximal- und Minimalwerten der Beobachtung VIII erhalten werden, geben jeweilen die Maximal- und Minimalzahlen der im gegebenen Zeitraum gebildeten Bacterien; derselbe entspricht der Anzahl der Minuten, welche man durch Subtraction der Zahl von Minuten, welche seit Beginn des Versuches bis zu der betreffenden Beobachtung vergingen, von 105, der gesamten Ver-

estes os valores maximos e minimos correspondentes a cada espaço de tempo:

minutos	max.	min.
105	0.65	0.51
90	0.56	0.44
75	0.43	0.27
60	0.32	0.18
45	0.26	0.12
30	0.18	0.06
15	0.30	—

Vejamos a media entre os valores maximos e minimos de cada tempo:

minutos	media
105	0.58
90	0.50
75	0.36
60	0.25
45	0.19
30	0.12

A diferença entre 0.58 e 0.50 corresponde á quantidade de microbios formados nos 15 primeiros minutos; entre 0.58 e 0.35 nos 30 primeiros, etc., assim:

minutos	quantidade
0	0.58
15	0.50
30	0.35
45	0.25
60	0.19
75	0.12

Apliquemos aos valores acima a formula

$$k = \frac{\log. C_0 - \log. C}{\delta},$$

que é a integração de $-dt/-dx = C\,k$, e calculemos a constante k:

minutos	valores	log. C_0 — log. C	0.4343 k
0	0.58	—	—
15	0.50	0.06446	0.0430
30	0.35	0.21836	0.0728
45	0.25	0.36549	0.0812
60	0.19	0.48468	0.0808
75	0.12	0.68425	0.0912

valor medio de $0.4343\ k = 0.0738$

suchszeit, erhält. Es sind dies die Maximal- und Minimalwerte, die jedem Zeitraum entsprechen:

Minuten	Max.	Min.
105	0.65	0.51
90	0.56	0.43
75	0.43	0.27
60	0.32	0.18
45	0.26	0.12
30	0.18	0.06
15	0.04	—

Hier sind die Mittel aus den Maximal- und Minimalwerten jedes Zeitraums:

Minuten	Mittel
105	0.58
90	0.50
75	0.36
60	0.25
45	0.19
30	0.12

Der Unterschied zwischen 0.58 und 0.50 entspricht den in den 15 ersten Minuten gebildeten Keimen; der zwischen 0.58 und 0.35 den in den ersten 30 Minuten etc., also:

Minuten	Anzahl
0	0.58
15	0.50
30	0.35
45	0.25
60	0.19
75	0.12

Wenden wir die obigen Werte auf die Formel

$$k = \frac{\text{Log. } C_0 - \text{Log. } C}{\delta}$$

an, welche die Integrale von $-dt/-dx = Ck$ ist und berechnen wir die Constante k:

Minuten	Werte	Log. C_0 — Log. C	0.4343 k
0	0.58	—	—
15	0.50	0.06446	0.0430
10	0.35	0.21836	0.0728
45	0.25	0.36549	0.0812
60	0.19	0.48468	0.0808
75	0.12	0.68425	0.0912

Mittelwert von $0.4343\ k = 0.0738$

0.0738 microbios seria pois o numero formado por 1.64 em cada minuto, si se retirassem os novos microbios formados, á medida de sua formação, se neutralizassem as substancias nocivas existentes e se adicionassem as gastas pela vejetação.

Conhecido assim a constante de multiplicação do bacilo tifico, em caldo á temperatura de 27.0 C. vejamos qual a concordancia entre os valores encontrados nas nossas observações e os calculados com o auxilio dessa constante:

0.4343 k	minutos	log. C_0 — log. C	valores
0.0738	0	—	0.58
—	15	0.1107	0.45
—	30	0.2214	0.35
—	45	0.3321	0.37
—	60	0.4428	0.21
—	75	0.5535	0.16
—	90	0.6642	0.12
—	105	0.7749	0.10

Damos agora no seguinte quadro, á coluna 1.ª, o numero de microbios da observação VIII e na 2.ª coluna o numero de microbios formados durante as diferentes fazes da experiencia. Subtraído dos valores da 1.ª coluna os seus correspondentes da 2.ª, obtemos os da 3.ª que, como já dissemos anteriormente, reprezentará para cada observação, o numero de colonias que se deveram encontrar, cazo a concordancia entre os numeros de colonias observadas e as calculadas com o auxilio da formula das reações monomoleculares fosse completo:

2.22 — 0.50 = 1.64
— — 0.45 = 1.77
— — 0.35 = 1.87
— — 0.27 = 1.95
— — 0.21 = 2.01
— — 0.16 = 2.06
— — 0.12 = 2.10
— — 0.10 = 2.12

Ainda nas tres colunas seguintes se encontram: na 1ª os valores medios de cada observação, na 2ª os calculados, na 3ª os mesmos valores aumentados ou diminuidos nos limites de seu erro medio provavel, com o fim

0.0738 wäre also die Anzahl der von 1.64 in jeder Minute gebildeten Keime, wenn man die neu gebildeten, in dem Maase, wie sie entstehen, entfernen würde, unter Neutralisirung der vorhandenen schädlichen Substanzen und Ersetzung der beim Wachstum verbrauchten.

Wenn demgemäss die Constante der Vermehrung des Typhusbacillus in Nährbouillon bei 27,0° bekannt ist, vergleichen wir die in unseren Beobachtungen gefundenen Werte mit den mit Hilfe dieser Constanten berechneten:

0.434 k	Minuten	Log. C_0 — Log. C	Werte
0.0738	0	—	0.58
0.0738	15	0.1107	0.45
0.0738	30	0.2214	0.35
0.0738	45	0.3321	0.37
0.0738	60	0.4428	0.21
0.0738	75	0.5535	0.16
0.0738	90	0.6642	0.12
0.0738	105	0.7749	0.10

Wir geben nun in der folgenden Tafel in der ersten Columne die Anzahl der Keime der Beobachtung VIII und in der zweiten diejenige der in den Versuchsphasen gebildeten:

2.22 — 0.50 = 1.64
2.22 — 0.45 = 1.77
2.22 — 0.35 = 1.87
2.22 — 0.27 = 1.95
2.22 — 0.21 = 2.01
2.22 — 0.16 = 2.06
2.22 — 0.12 = 2.10
2.22 — 0.10 = 2.12

In der nachfolgenden Tabelle findet man in der ersten Columne die Mittelwerte jeder Beobachtung, in der zweiten die berechneten und in der dritten dieselben, aber innerhalb der Grenzen der wahrscheinlichen Versuchsfehler vermehrt und vermindert, um die innerhalb der Fehlergrenzen bestehende Uebereinstimmung zwischen den berechneten und beobachteten Werten zu zeigen:

de mostrar a concordancia dentro desses limites, entre os valores calculados e observados:

observação	valores obs.	valores calc.	valores obs. e cor.
I	1.64	1.64	1.64
II	1.72	1.77	1.77
III	1.87	1.88	1.88
IV	1.97	1.95	1.95
V	2.03	2.01	2.01
VI	2.10	2.06	2.06
VII	2.25	2.10	2.25
VIII	2.22	2.12	2.20

A concordancia é completa nas 6 primeiras observações; a V porem, está já provavelmente em dezacordo, pois foi necessario o maior afastamento permitido para que a concordancia fosse completa entre o valor da 2ª e 3ª colunas. Na VIII o afastamento é bastante grande. Esta discordancia deve ser atribuida á formação de novos microbios, dotados, como os primeiros, da faculdade de reprodução, capazes de compensarem, por esta razão, o decrecimento das substancias nutritivas, no meio de cultura.

Devemos, pois, á serie de analojias que RAULIN indicou, entre a formação dos vejetais e a dos compostos não organizados acrecentar a seguinte:

A formação de certos vejetais microscopicos se faz segundo a mesma lei que reje a dos compostos não organizados (Lei de GULDBERG-WAAGE).

Beobachtung	Beob. Werte	Berechn. Werte	Beob. und corr. Werte
I	1.64	1.64	1.64
II	1.72	1.77	1.77
III	1.87	1.88	1.88
IV	1.97	1.95	1.95
V	2.03	2.01	2.01
VI	2.10	2.06	2.06
VII	2.25	2.10	2.25
VIII	2.22	2.12	2.20

In den ersten 6 Beobachtungen ist die Uebereinstimmung eine vollständige; die fünfte jedoch stimmt wahrscheinlich bereits nicht mehr überein, da die grösste Abweichung nötig war, um die völlige Uebereinstimmung zwischen den Werten der zweiten und dritten Columne herbeizuführen. In Beobachtung VII und VIII ist die Abweichung ziemlich gross. Dieselbe muss der Bildung neuer Keime zugeschrieben werden, welche, wie die ersten, reproductionsfähig sind und deshalb die Abnahme der Nährsubstanzen in dem Culturmedium compensiren können.

Wir müssen daher der Reihe von Analogien, welche RAULIN zwischen der Bildung pflanzlicher Zellen und derjenigen unorganischer Verbindungen angegeben hat, die Folgende hinzufügen:

Die Bildung gewisser mikroscopischer Pflanzen geht nach demselben Gesetze vor sich, welches die nicht organisierten Körper regiert (Gesetz von GULDBERG-WAAGE).

Echinostomum crotophagae, n. sp.

Novo parazito do anú azul. Crotophaga maior. L.

pelo

Dr. Gomes de Faria.

(Estampa 5)

Echinostomum crotophagae, n. sp.

A new parasite of the blue anú, Crotophaga maior, L.

by

Dr. Gomes de Faria.

(With plate 5)

Material:

O material que serviu para a descrição desta especie foi em parte colecionado por nós, em diversos exemplares de *Crotophaga maior*, caçados nas marjens dos Rios Tieté e Paraná e tambem em 2 exemplares trazidos do Estado do Pará pelo Dr. A. Lutz.

Habitat:

Vive no intestino delgado do anú azul, — *Crotophaga maior L.*

Caracteres externos:

Dimensões: O comprimento varia entre 3 mm e 8 mm e a largura maxima entre 1 mm e 1,9 mm. Os exemplares estudados têm as seguintes dimensões:

	Largura maxima	Comprimento
1. exemplar	1,2 mm	6 mm
2. »	1,5 mm	7 mm
3. »	1,6 mm	6 mm
4. »	1,5 mm	6,5 mm
5. »	1,0 mm	3 mm
6. »	1,9 mm	8 mm

Côr:

Quando vivos, são de côr branca acinzentada.

Movimentos:

Logo que são tirados do animal e examinados em agua fiziolojica mostram vivos mo-

Source of Material:

This species has ben described from several specimens collected by the author while hunting on the margins of the rivers Tieté and Paraná and from two other specimens brought by Dr. Lutz from the state of Pará.

Habitat:

Small intestine of the *Crotophaga maior L.*

External caracters:

Size: The parasites vary from 3 mm to 8 mm in length, and from 1 mm to 1,9 mm in maximum breadth. Six specimens gave the following measurements in millimeters:

	maximum breadth	length
1st specimen	1,2 mm	6 mm
2nd »	1,5 mm	7 mm
3rd »	1,6 mm	6 mm
4th »	1.5 mm	6,5 mm
5th »	1,0 mm	3 mm
6th »	1,9 mm	8 mm

Colour:

Greyish white, when living.

Movements of the worm:

The living worm when taken from the animal and placed in salt solution showed

vimentos de alongamento e retração do corpo, assim como tambem tendem a enrolar-se.

Fórma:

O corpo é fuziforme, a extremidade anterior, afilada e a posterior tambem afilada termina em saliencia obtuza. Entre a ventoza bucal e ventral o corpo sofre um achatamento, o que o torna mais delgado.

Superficie:

Na face dorsal, o tegumento externo até ao nivel do póro genital é revestido de espinhos que na face ventral chegam até o limite dos $^{3}/_{4}$ anteriores do parazito. Os espinhos do tegumento externo vão se tornando mais raros e menores, á proporção que se aproximam da extremidade posterior.

Segmento cefalico:

O segmento cefalico é formado por uma orla ou gola espessa que cerca a ventoza bucal. Esta orla quazi circular é largamente chanfrada em lozango na face ventral. Na borda livre da orla inserem se os espinhos como cercadura, variando o numero delles nos diversos individuos, atinjindo no maximo a 36. Em um exemplar contámos 32 e em outro 33.

A inserção faz-se profundamente no tegumento externo. Os espinhos são cilindro-conicos com a extremidade livre afilada. O tamanho dos espinhos é variavel, sendo maiores aquelles que se aproximam da chanfradura ventral.

Os maiores medem de 156 a 160 *micra*, os menores de 134 a 140. São inseridos em uma unica fileira regular, tendo as pontas voltadas para a extremidade superior do verme. Ao nivel da chanfradura ventral a cuticula externa sofre um reviramento para baixo, de modo que, em geral, quatro espinhos ao mesmo tempo se voltam para dentro e tomam inserção um pouco mais acima da fileira regular, sotopondo-se aos que formam esta ultima.

A ventoza bucal acha-se situada no centro do segmento cefalico. E' quazi circular, porem achatada no sentido antero-posterior. Em seção transversal esta ventoza mostra contorno imperfeitamente circular, notando-se as paredes fortemente musculozas, constituidas sobretudo de fibras radiarias entre as quais se encontram, as bem conhecidas celulas nervozas:

brisk movements of extension and retraction, as well as a certain tendency to roll up.

Shape:

The specimens are canoe shaped with an attenuated oral and caudal extremity. The latter ends in a blunt protrusion. Between the oral and ventral sucker the worm is semewhat flattened and therewise somewhat, slender.

Surface:

Dorsally the external surface is provided with spines all along till the genital pore, and ventrally the spines cover $^{3}/_{4}$ of the surface of the worm. The spines grow smaller and rarer towards the posterior extremity.

The head:

The head consists of a thick expanded disc in the center of which there is the oral sucker. The almost circular disc shows ventrally a lozenge form hollow. The margin of the disc is set with a single row of spines varying in number. The largest number we could count was 36. One specimen had 32 and an other 33 apines. The spines are cylindro-conical with an attenuated extremity. They are deeply inserted in the skin surface. Varying in size, the largest ones are those near the lozenge form hollow.

The largest ones measure 134 to 140 micra. They mantain one straight line and their extremity points to the caudal end of the worm. At the level of the ventral hollow the cuticle turns downwards so that four of the spines are inward turned and inserted at a somewhat higher level than the regular line of insertion. The almost round sucker, situated in the center of the head is flattened antero-posteriorly. A transverse section shows that the mouth sucker is not quite round; microscopically the well developped muscles, consisting mostly of radical fibres and amongst these the well known nervous cells are to be seen.

The oral sucker measures 184 micra an-

As dimensões desta ventoza são:
Exemplar de 6,5 mm:
Diametro antero-posterior 184 *micra,*
» transverso 226 »
Exemplar de 6 mm:
Diametro antero-posterior 120 *micra,*
» transverso 152 »

Ventoza ventral:

Esta ventoza é bem dezenvolvida nesta especie, sendo muito maior que a bucal. Tem a fórma ovoide, cuja extremidade mais fina acha-se voltada para o polo posterior do corpo. Fica situada para o terço anterior do corpo, é saliente, fortemente musculoza, tendo a abertura mais ou menos circular voltada para o segmento cefalico:

As dimensões são as seguintes:
Exemplar de 7 mm.:
Diametro antero-posterior 1,11 mm
» transversal maximo 420 *micra*
Exemplar de 7 mm.:
Diametro antero-posterior 764 *micra*
» transversal maximo 736 »
Exemplar de 6 mm:
Diametro antero-posterior 792 *micra*
» transversal maximo 770

A distancia entre a ventoza anterior e posterior é em um exemplar de 7 mm de 550 *micra* e em um outro de 8 mm de 772 *micra.*

Póro genital:

O póro genital fica situado um pouco para traz da ventoza ventral e imediatamente para diante da bifurcação intestinal.

Anatomia interna

Aparelho dijestivo:

Este aparelho é formado de um muito curto prefaringe que nace no centro da ventoza bucal. Segue-se a este um farinje bem dezenvolvido, piriforme, de paredes fortemente musculozas e cuja luz examinada em seção transversal é triangular.

As dimensões são as seguintes:
Exemplar de 6,5 mm.:
Diametro antero-posterior 192 *micra*
» transversal maximo 180 »
Exemplar de 6,5 mm.:
Diametro antero-posterior 220 *micra*
» transversal 160 »

tero-posteriorly and 226 micra transversally in specimen 6,5 mm long and 120 micra antero-posteriorly and 152 micra transversally in specimen 6 mm long.

Ventral sucker:

In the anterior third of the worm lies the well developped ventral sucker ovoid in form and much larger than the oral sucker, the attenuated extremity is turned towards the caudal extremity. The muscles of the protruding ventral sucker are well developped. The more or iess circular orifice is iurned towards the cephalic extremity.

The ventral sucker measures 1,11 micra antero-posteriorly and 420 micra transversally in specimen 7 mm long, 764 micra antero-posteriorly and 736 micra transversally in specimen 7 mm, 792 micra antero-posteriorly and 770 micra transversally in specimen 6 mm long.

The space between the oral and ventral sucker measures 550 micra in spesimen 7 mm long and 772 micra in specimen 8 mm long.

Genital pore:

The genital pore is situated caudad of the ventral sucker and cephalad of the intestinal fork.

Internal anatomy.

Digestive tract:

Extending from the center of the oral sucker a very short prepharynx may be distinguished.

From the prepharynx rises a well developped, musculous, pear shaped pharynx; the lumen of the latter appears triangular in tranverse section.

The measurements in micra are the following:

Specimen
6,5 mm long 192 micra antero-posteriorly
180 » transversally
6,5 mm long 220 » antero-posteriorly
160 » transversally
7 mm long 228 » antero-posteriorly
222 » transversally

Exemplar de 7 mm.:

Diametro	antero-posterior	228 *micra*
»	transversal	222 »

Do faringe nace um ezofago curto e fino que se bifurca em *U* para formar os dois tubos cecais.

A bifurcação se faz em $^1/_{10}$ mais ou menos do comprimento total da borda da extremidade cefalica do corpo e imediatamente para traz da abertura genital.

Os dois cecos ou ramificações intestinais se colocam nas partes laterais do corpo junto ás bordas, contornando o *acetabulum,* ficando em parte cobertos pelas glandulas vitelojenas ás quais excedem um pouco na parte posterior do corpo, onde terminam em fundo de saco. Não aprezentam sinal de ramificação ou anastomoze:

Aparelho genital:

Orgãos masculinos: Os testiculos ficam situados na metade posterior do corpo entre os tubos intestinais. São implantados mais para a superficie ventral que para a dorsal; têm a fórma ovoide, o maior diametro sendo antero-posterior. São colocados, um logo apoz outro, sendo separados apenas por pequena faixa de tecido conjuntivo do parenquima.

O testiculo posterior é um pouco maior que o anterior; vistos em preparados *in-toto,* o contorno é perfeitamente regular, porem nos córtes aprecia-se uma nitida lobulação.

As dimensões dos testiculos são as seguintes:

Exemplar de 6,5 mm.:

Testiculo anterior:

Diametro	antero-posterior	600 *micra*
»	transverso	410 »

Testiculo posterior:

Diametro	antero-posterior	630 *micra*
»	transverso	410 »

Exemplar de 7,5 mm.:

Testiculo anterior:

Diametro	antero-posterior	680 *micra*
»	transverso	444 »

Testiculo posterior:

Diametro	antero-posterior	790 *micra*
»	transverso	400 »

De cada testiculo parte lateralmente um vazo efarente bem dezenvolvido e que se

From the pharynx springs a short slender and thin walled esophagus. At about one tenth of the total body length the esophagus divides in two cecal tubes which at first pass outward toward the lateral margins, follow these margins and then surround the acetabulum. Partly covered by the vitellogene glands they terminate at the caudal extremity free from these glands. There is no sign of anastomosis or ramifacation.

Genital system:

Male organs: The testicles lie in the caudal half of the worm in the area included between the intestinal ceca, somewhat nearer the ventral than the dorsal surface. Ovoid in form their largest diameter is the antero-posterior. One is directly caudad of the other; the two being separated one from the other by a narrow intervall occupied by connective tissue.

The posterior testicle is somewhat larger than the anterior. In press preparations their outlines are perfectly regular, but sections show them to be so markedly indented as to amount to a very distinct lobation.

The measurements of the testicles are the following:

Specimen 6,5 mm long

Anterior testicle	600	micra	antero-posteriorly
	410	»	transversally
Posterior testicle	630	»	antero-posteriorly
	410	»	transversally

Specimen 7,5 mm long

Anterior testicle	680	micra	antero-posteriorly
	444	»	transversally
Posterior testicle	790	»	antero-posteriorly
	400	»	transversally.

A well developped vas efferens rises laterally from each testicle. They are entirely full of spermatozoa. In spite of a large number of sections we could not follow the traject of these tubes.

Near the genital pore lies a large bilobated vesicula seminalis externa completely full

aprezenta literalmente cheio de espermatozoides. Não foi possivel seguir todo o trajeto destes tubos, apezar do grande numero de seções seriadas que praticámos.

Proximo á abertura genital encontra-se larga vezicula seminal externa ou masculina bilobada que se juxtapõe á ventoza ventral, aprezentando-se completamente cheia de espermatozoides e envolvida ainda em espessa membrana que envolve todo o complexo dos orgãos genitais externos. Esta vezicula seminal é muito bem dezenvolvida e tão grande que não hezitamos em consideral-a como caracteristica da especie em questão.

A bolsa do cirro é bem dezenvolvida, muito espessa e contem o penis, que é cilindro-conico, curto e de superficie liza. Tanto a vezicula seminal como o penis são cercados de numerozas celulas glandulares fuziformes que não trepidamos em considerar como elementos prostaticos.

O dezenho que produzimos dá perfeita idéa da descrição destes orgãos. (Est. 5, fig. 2).

Orgãos genitais femininos:

O ovario fica situado para diante dos testiculos, na linha mediana entre os 2 tubos intestinais e ocupa aproximadamente o meio do corpo. E' esferico, muito menor que os testiculos, tendo as seguintes dimensões:

Exemplar de 7 mm.: 290 *micra* de diametro
» de 6 mm.: 280 » » »

Colocado logo para traz do ovario encontra-se o ootipo, bem dezenvolvido de contorno ovoide, ocupando quazi toda a largura do animal e sempre cheio de espermatozoides e ovos em varios estados de maturação.

O ootipo recebe lateralmente os dois vitelodutos e posteriormente o canal de *Laurer* que é muito fino, mostrando-se completamente cheio de espermatozoides.

Como continuação do ootipo nace o utero que rodeia o ovario, prolongando-se para diante, descrevendo circumvoluções complicadas; depois, tornando-se mais simples contorna lateralmente a ventoza ventral, indo abrir-se no antro genital.

As glandulas vitelojenas, são dispostas nos campos laterais e estendem-se desde a ventoza ventral até ás extremidades dos dois cécos

of spermatozoa. The vesicula seminalis lays next to the ventral sucker and is covered by a thick membrane which envelops the external male organs. The vesicula is so large that we do not hesitate in considering it characteristic of the specimen which we are describing.

The well developped and quite thick cirrhus pouch contains the cylindro conical smooth surfaced penis. Both the vesicula seminalis and the cirrhus pouch are surrounded by numerous glandular cells which we do not hesitate to interpret as prostatic cells. (The drawing 2, plate 5 gives a perfect idea of the description of the male organs).

Female organs:

Cephalad of the testicles the interspace between the cecal tubes contains the ovary situated in the median line more or less in the middle of the total body length. The ovary is a globular body much smaller than the testicles and measures:

Specimen 7 mm long 290 micra in diameter
» 6 mm » 280 » » »

Caudad of the ovary lies the well developped, ovoid in form ootyp which occupies most the whole breadth of the worm. The ootyp contains always spermatozoa and ova in different phases of maturation.

The ootyp receives laterally the two vitelloducts and posteriorly Laurier's canal extremely narrow and entirely filled with spermatozoa.

From the ootyp appearing like a continuation there emerges the uterus which surrounds the ovary and then forms numerous coils; futher on, simpler, it surrounds laterally the ventral sucker and opens in the genital cavity.

The vitellogene glands lie in the lateral areas, beginning at the level of the ventral sucker and extending to the extremity of the cecal tubes, not exceeding the latter. These vitellaria are composed of a large number of

... excedem estes ultimos. Estas ... são formadas de grande numero de ... de contorno poligonal e grupados ... irregularmente, formando uma faixa de cada ... do corpo do animal.

Ovos:

Os ovos retirados do utero aprezentam-se com fórma oval e côr amarello-parda que lhes é dada pelo envoltorio, aliaz pouco espesso, é granulozo, sendo apenas nitidas as celulas que contem, que só são bem apreciadas nas ... apenas se observam as celulas ... constituir o futuro miracidium.

Os ovos retirados dos ... maiores

Diametro long. ...

Aparelho excretor:

Este aparelho em traços ... apreciavel no 5.º posterior do ... de ... 2 vezes em Y, ... pequenas ramificações ... pequena empola, logo ... dichotomização, vindo abrir-se ... prolongamento terminal do corpo.

Diagnoze especifica:

1.º A dispozição dos espinhos, na orla, em fileira unica regular, sendo alguns destes revirados para dentro, nas vizinhanças da ...

2.º ...

3.º ...

4.º A dispozição ... que se estendem desde a ventosa até a terminação do cécum ...

5.º A dispozição dos orgãos genitaes ... bilobada cercada de glandulas prostaticas.

6.º O aparelho excretor, que forma na parte posterior do verme um duplo Y.

Echinostomum crotophagae n. sp.

Fig. 1

a — oral sucker
b — pharynx
c — esophagus
d — genital pore
e — vesicula seminalis
f — penis
g — acetabulum
h — uterus
i — vitellaria
j — ovary
k — ootyp
l — testicles
m — excretory system
n — cecal tubes
o — excretory pore

Fig. 2

Head

a — oral sucker
b — pharynx

Fig. 3

Enlarged 232

A — vesicula seminalis
B — prostatic cells
D — penis
D — genital pore
E — uterus
F — acetabulum

... scattered irregularly, polygonal follicles, forming a band on each side of the worm.

Ova:

The uterine egg is oval in form owing to the membrane, in which it is inclosed and brownish yellow in colour.

The egg is provided with a very small ... and contains a granular mass; the ...

The eggs never contain embryos; one can ... future miracidium.

The average measurements of eggs of the largest specimens were ...

Excretory system:

In the posterior fifth of the body the excretory tract is single and median. The tract divides twice in two lateral branches forming a double Y and further on in ... anastomoses.

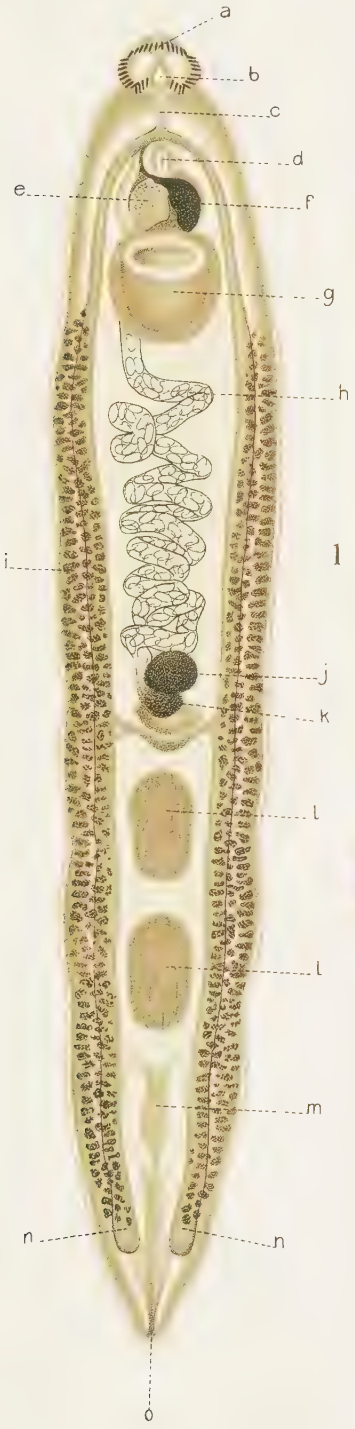
After the first division the tract dilates into a cavity and opens on the external surface in the caudal extremity of the ...

Specific diagnosis:

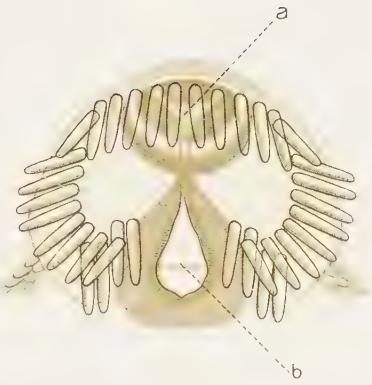
1. The disposition of the spines, in one straight line, some ... turned near the ventral hollow.

The number of spines varying from 32 to 36. The size of the ... and ventral sucker.

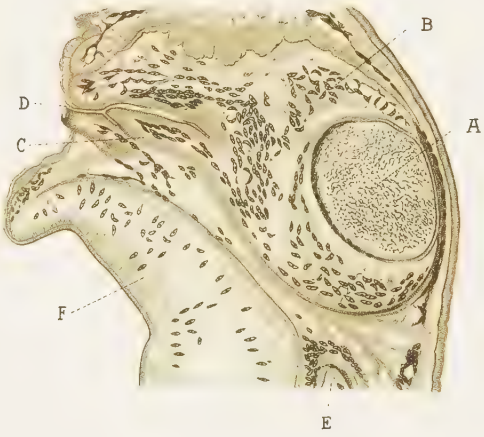
... oral sucker till the ... The disposition of the ... glands and principally the enormous ... vesicula seminalis surrounded ... glands. The excretory system ...



1



2



3

A. Silva
ad. nat. del.

Duplicidade morfolojica nos infuzorios ciliados

pelo

Dr. S. von Prowazek

(Estampa 6)

Formdimorphismus bei ciliaten Infusorien

von

Dr. S. von Prowazek

(Tafel 6)

Foi MAUPAS o primeiro que descobriu a duplicidade morfolojica no infuzorio ciliado *Leucophrys patula Ehrb.* e ligou o fato a um fenomeno sexual desse interessante infuzorio. O *Leucophrys patula* possue 2 fórmas: uma grande, de movimentos muito ativos, que cambaleando e girando multîplas vezes em torno de seu eixo nada no infuzo em que vive; já MAUPAS estabeleceu com justeza suas caracteristicas morfolojicas. A fig. 1 mostra sua estrutura: o citostoma é grande e provido de 2 membranulas em fórma de labios. Abaixo do citofarinje nota-se um grande alveolo alongado. Esta grande fórma de infuzorio de rapina engole em quantidades consideraveis pequenos infuzorios e, em pouco tempo, seu endoplasma se enche de vacuolos nutritivos, fortemente refrinjentes. Os infuzorios deglutidos que se movem ainda durante certo tempo no interior dos vacuolos tornam-se, no fim de 10', um tanto refrinjentes e coram-se em avermelhado pelo *Neutralrot;* em mais ou menos 20', paralizam-se e tomam então a conhecida côr vermelha do *Neutralrot* que traduz a reação *acida.* Mais tarde, mercê da reação alcalina dos fermentos dijestivos, essa coloração muda para vermelho amarelado. Os restos alimentares não dijeridos são eliminados para o exterior atravez um

MAUPAS hat zuerst bei dem ciliaten Infusorium *Leucophrys patula* Ehrb. einen Formdimorphismus entdeckt und brachte ihn mit den *sexuellen* Erscheinungen dieses interessanten Infusors in Zusammenhang. *Leucophrys patula* besitzt 2 Formen: eine grosse, lebhaft bewegliche Form, die schwankend, vielfach um ihre Achse rotierend, in der Infusion dahinschwimmt; ihre morphologische Eigentümlichkeiten sind bereits von MAUPAS zutreffend geschildert worden. Ihr Aufbau geht aus Figur 1 hervor; das Cytostom ist gross und mit zwei lippenförmigen Membranellen ausgestattet. Unter dem Cytopharynx nimmt man meist eine grosse, längliche Aveole wahr. Diese grosse, räuberische Form verschlingt in beträchtlicher Menge kleine Infusorien und ihr Endoplasma ist bald erfüllt von stark lichtbrechenden Nahrungsvakuolen. Die aufgenommenen Infusorien bewegen sich noch eine zeitlang in der Nahrungsvakuole, werden jedoch nach etwa 10 Minuten etwas lichtbrechend und färben sich mit Neutralrot in einer rötlichen Nüance; nach ungefähr 20 Minuten sind sie zumeist gelähmt und nehmen den bekannten, *sauern* roten Farbton des Neutralrots an. Später schlägt diese Nüance unter Einfluss der alkalisch reagierenden Verdauungsfermente in ein Gelbrot um. Die unverdauten Nahrungs-

citopijio de formação temporaria. Essa excreção se faz sob a fórma de bolos, cuja côr primitiva se acha empalidecida, manifestando-se esta agóra com uma tonalidade vermelha lilaz. Na temperatura de cerca de 28º C. o vacuolo contratil pulsa por 10 a 14 segundos.

Ao lado dum grande macronucleo rico em cromatina e que ás vezes possue um cariozoma, (Est. 6 Fig. 2, 3) vê-se um micronucleo menor, compacto e que, segundo o modo comum, se divide mitozicamente (Est. 6 Fig. 2) como os pequenos nucleos dos infuzorios. O caryozoma do grande nucleo, que falta muitas vezes completamente, sofre processos ciclicos e, óra aprezenta-se perfeitamente formado, óra dezaparece por completo. (Est. 6 Fig. 2 e 3; 1) Em determinado estadio da divizão celular, aprezenta contornos perfeitamente nitidos, tornando-se indistinto logo que o nucleo se estira lonjitudinalmente. O grande nucleo multiplica-se por divizão direta; por ocazião de seu estrangulamento, uma parte de cromatina, que claramente, em parte, pertence ao cariozoma, reune-se no meio do nucleo em ampulheta, sob a fórma de um botão e, por ocazião dos subsequentes estadios da divizão *elimina-se* (Est. 6 Fig. 7 a 10.) Essa massa de cromatina, que permanece apenas em *uma* das porções divididas (Est. 6 Fig. 10, 11, 12) reune-se em bola, dejenera e é finalmente *eliminada*. Deste modo se verifica que, *independentemente* do estrangulamento do corpo celular, se dá *em cada vez uma diminuição da cromatina*, por ocazião da divizão celular. Em uma serie de trabalhos anteriores foi estabelecido o fato de que o cariozoma das celulas dos protozoarios corresponde a um segundo nucleo. De acôrdo com essa concepção, as celulas dos ciliados. que possuem dous nucleos morfolojicamente diferenciados: o macro e o micronucleo, tornam-se, em determinados estadios, quadrinucleados, desde que nesses dous nucleos apareçam cariozomas. O centrozomio dos metazoarios corresponde filojeneticamente ao cariozoma dos protozoarios e, sendo assim, deve-se fazer corresponder o *Spindelrestkoerper* de *Flemming* ou o corpo intermediario do fuzo central ao *Diminutionskoerper* do carioreste werden am Hinterende des Infusors durch eine temporär entstehende Cytopyge in Ballenform nach aussen abgestossen und blassen über ein eigenartiges Lilarot alsbald ab. Die kontraktile Vakuole pulsiert bei einer Temperatur von ca. 28º C. in 10 bis 14 Sekunden.

Neben dem grossen chromatinreichen Macronucleus, der zuweilen ein Caryosom besitzt (Taf. 6, Fig. 2, 3), liegt ein kleiner, kompakter Micronucleus, der sich nach Art der Kleinkerne der Infusorien in der üblichen Weise mitotisch teilt (Taf. 6, Fig. 2). Das Caryosom des Grosskerns, das oft gänzlich fehlt, unterliegt zyklischen Prozessen und ist bald deutlich ausgebildet, bald verschwindet es vollkommen (Taf. 6, Fig. 2 u. 3). Auf einem gewissen Stadium vor der Zellteilung ist es ziemlich scharf abgegrenzt und wird erst undeutlich, sobald sich der Kern der Länge nach streckt. Der Grosskern teilt sich auf direkte Weise; bei der Durchschnürung desselben wird ein Teil des Chromatins, das offenbar teilweise dem Caryosom angehört, in der Mitte des hantelförmigen Kerns, in der Form eines Knotens zusammengeballt und bei der weiteren Teilung aus dem Kern *eliminiert* (Taf. 6, Fig. 7 bis 10). Bald klumpt diese Chromatinmenge, die nur in dem *einen* Teilsprössling liegen bleibt (Taf. 6, Fig. 10 u. 11), zu einem Ballenkörper zusammen, degeneriert und wird schliesslich *ausgestossen*. Es findet derart *unabhängig* von der Zellleibdurchschnürung eine *jedesmalige Diminution des Chromatins* bei der Zellteilung statt. In einer Reihe von früheren Arbeiten wurde der Nachweis erbracht, dass das Caryosom der Protozoenzelle einem zweiten Kern entspricht. Auf Grund dieser Betrachtungen wäre die Ciliatenzelle, die 2 morphologisch differenzierte Kerne als Macro- und Micronucleus besitzt, auf gewissen Stadien vierkernig, sobald in diesen beiden Kernen Caryosome auftreten. Phylogenetisch entspricht dem Centrosom der Metazoenzelle das Caryosom der Protozoenzelle und daher muss man den Spindelrestkörper FLEMMING'S oder den Zwischenkörper der Centralspindel mit dem eben beschriebenen Diminutionskörper des Caryosoms der ciliaten Zelle vergleichen. Bei *Leucophrys* fällt die Diminution des Kern-

zoma das celulas dos ciliados, acima descritos. No *Leucophrys* a diminuição da cromatina nuclear não coincide, em tempo, com o estrangulamento plasmatico, como é o cazo nas celulas dos metazoarios e metafitos. Póde-se comparar morfolojicamente os corpos intermediarios dos esparmatocitos da *Helix* diretamente com as porções de diminuição do cariozoma do *Leucophrys*.

A outra fórma do *Leucophrys* dimorfo (Est. 6 Fig. 4, 5, 6, 13 e 14) é essencialmente menor, a boca é semelhante á do *Glaucoma pyriformis* como tambem esta fórma póde ser facilmente confundida com o *Glaucoma*. Contrariamente á outra fórma descrita do *Leucophrys*, que devora pequenos protozoarios, alimenta-se esta de materiais nutritivos que vèm em remoinhos impelidos pelos cilios e que são constituidos, sobretudo, de bacterios. E' digno de nota que nesta pequena fórma semelhante ao *Glaucoma falta* muitas vezes o micronucleo, que parece ter *imigrado* para o interior do macronucleo. (Est. 6 Fig. 5 e 13).

Que significação tem esse diformismo? MAUPAS considera a fórma pequena, em que muitas vezes falta o citostoma, como o *animal sexuado*. Na maioria dos cazos consegui pela adição de quinina a 1:80000 obter culturas das fórmas grandes de *Leucophrys* provenientes das pequenas e que se aprezentavam nas culturas, no fim de 3 dias, que se multiplicavam no fim de 4 e que, mais tarde de novo davam orijem a fórmas pequenas. Nunca verifiquei a existencia de conjugação e por isso, contrariamente a MAUPAS *não* considero como baze do dimorfismo dos infuzorios a sexualidade; aceito, de preferencia, a concepção inedita de SCHAUDINN, assim como os rezultados experimentais de ENRIQUES sobre o *Chilodon*, de que os protozoarios *já* se acham diferencialmente *sexuados*, mas que apenas a sexualidade nem sempre se estampa no sentido morfolojico como nos hemosporidios e em varios coccidios *(Cyclospora)*. Teoricamente estou inclinado a aceitar que nos protozoarios se observa uma *geração alternante* de especie primaria, que tambem se póde separar em 2 modalidades diversas de processos sexuais. Nos Testacios, segundo SWARCHROMATINS zeitlich nicht mit der Plasmadurchschnürung zusammen, was bei den Metazoen- und Metaphytenzellen stets der Fall ist. Die Zwischenkörper der Spermatocyten von *Helix* kann man morphologisch direkt mit den Diminutionsteilen des Caryosoms von *Leucophrys* vergleichen.

Die andere Form der dimorphen *Leucophrys* (Taf. 6, Fig. 4, 5, 6, 13 u. 14) ist wesentlich kleiner, ihr Mund ist dem von *Glaucoma pyriformis* ähnlich, wie überhaupt diese Form leicht mit *Glaucoma* verwechselt werden kann. Im Gegensatz zu den zuerst geschilderten Leucophrysstadium, das kleinere Protozoen verschlingt, ernährt sie sich durch Zustrudeln von Nahrung, die vorwiegend bakterieller Natur ist. Bemerkenswert ist, dass bei dieser kleinen glaucomaähnlichen Form der Micronucleus vielfach *fehlt;* er scheint in das Innere des Macronucleus *einzudringen* (Taf. 6, Fig. 5, 13).

Welche Bedeutung besitzt nun dieser Dimorphismus? MAUPAS fasste die kleineren Formen, deren Cytostoma öfters verschwindet, als *Sexualtiere* auf. Mir gelang es in der Mehrzahl der Fälle, durch Zusatz von Chinin 1:80.000 aus den kleinen Formen die grossen *Leucophrys* zu züchten, die in den Kulturen zumeist am 3. Tage auftauchten, sich am 4. Tage vermehrten und später wieder in die kleineren Formen umbildeten. Nie wurde von mir eine Conjugation beobachtet und ich sehe daher im Gegensatz zu MAUPAS die Sexualität *nicht* als Grund für den Dimorphismus der Infusorien an, nehme vielmehr im Anschluss an nicht veröffentlichte Ideen von SCHAUDINN sowie an die Ergebnisse der Experimentaluntersuchungen von ENRIQUES an *Chilodon* an, dass die Protozoen *stets sexuell* differenziert sind, nur dass die Sexualität nicht immer derart im morphologischen Sinne ausgeprägt ist wie bei den Hämosporidien und manchen Coccidien *(Cyclospora)*. Theoretisch bin ich geneigt anzuuehmen, dass bei den Protozoen überhaupt ein *Generationswechsel primärer* Art vorkommt, der sogar mit zwei Modi von sexuellen Vorgängen abschliessen kann. Bei den Testaceen tritt nach SWARCZEWSKY und ZÜLZER eine Chromidiogamie

CZEWSKI e ZUELZER ocorre a cromidiogamia ao lado da heterogamia. Conhece-se tambem no ciclo evolutivo de *Trichomonas* e do *Bodo lacertae* a heterogamia, ao lado do processo autogamico muito mais conhecido. (*) De outro lado, conhecemos em alguns protozoarios duplicidade de fórmas de multiplicação vejetativa: no plasmodio da malaria humana e da do macaco foi observada, ao lado de multipla esquizogonia, tambem, a simples multiplicação dos *merontes (pedogomia)*. O mesmo parece se dar nos coccidios. Nos infuzorios as entidades morfolojicamente eguais de *Glaucoma* e *Colpidium* etc. separam-se fiziolojicamente em duas series, das quais uma é muito mais *rezistente* que a outra ás substancias ou alcaloides que ajem por osmoze Em favor de uma alternancia de geração tambem caraterizavel morfolojicamente falam ainda as observações de von LEBEDEW sobre a primitiva *Trachelocerca* ou de JOSEPH sobre o *Loxodes*.

(*) Sem duvida, deve-se notar que nestes dois cazos não se verifica a dupla fecundação, porque, segundo HARTMANN, em um cazo (Cromidiogamia dos testacios) deve-se tratar, apenas, de plastogamia e, no outro (autogamia do Bodo) de modificação da heterogamia habitual, isto é, partenogamia (Hartmann, Autogamie bei Protisten, Jena, 1909).

neben einer Heterogamie auf; aus dem Entwicklungszyklus von *Trichomonas* und *Bodo lacertae* ist sowohl eine Heterogamie, als die viel häufigere Autogamie bekannt. (*) Andererseits kennen wir von einigen Protozoen wiederum *zwei* Arten von vegetativer Vermehrung; bei den Malariaplasmodien des Menschen und der Affen ist neben einer multiplen Schizogonie auch eine einfache Vermehrung der Meronten (Paedogonie) beobachtet worden. Auch bei den Coccidien scheinen ähnliche Verhältnisse vorzuliegen. Bei den Infusorien spalten sich die morphologisch gleichartigen Formen von *Glaucoma, Colpidium* u. a. physiologisch insofern in *zwei* Reihen, als die einen Formen osmotisch wirksamen Substanzen oder Alkaloiden gegenüber viel *resistenter* sind. Für einen sogar morphologisch nachweisbaren Generationswechsel sprechen aber die Beobachtungen von LEBEDEW an der primitiven *Trachelocerca* oder von JOSEPH an *Loxodes*.

(*) Allerdings muss bemerkt werden, dass in diesen beiden Fällen die doppelte Befruchtung nicht bewiesen ist, da es sich nach HARTMANN in dem einen Fall (Chromidiogamie der Testaceen) nur um eine Plastogamie, im andern (Autogamie von *Bodo*) um eine Modifikation der gewöhnlichen Heterogamie, nämlich eine Parthenogamie, handeln soll (Hartmann, Autogamie bei Protisten, Jena 1909).

ESTAMPA 6

Fig. 1-2. Fórma grande de *Leucophrys patula;* á fig. 2 vêm-se o micronucleo em divizão e o macronucleo com cariozoma.
Fig. 3. Macro e micronucleo da fórma grande; o primeiro com o cariozoma.
Fig. 4-6. Fórma pequena do *Leucophrys;* á fig. 5 sem o micronucleo.
Fig. 7-12. Divizão da fórma grande.
Fig. 13-14. Divizão da fórma pequena.

TAFEL 6

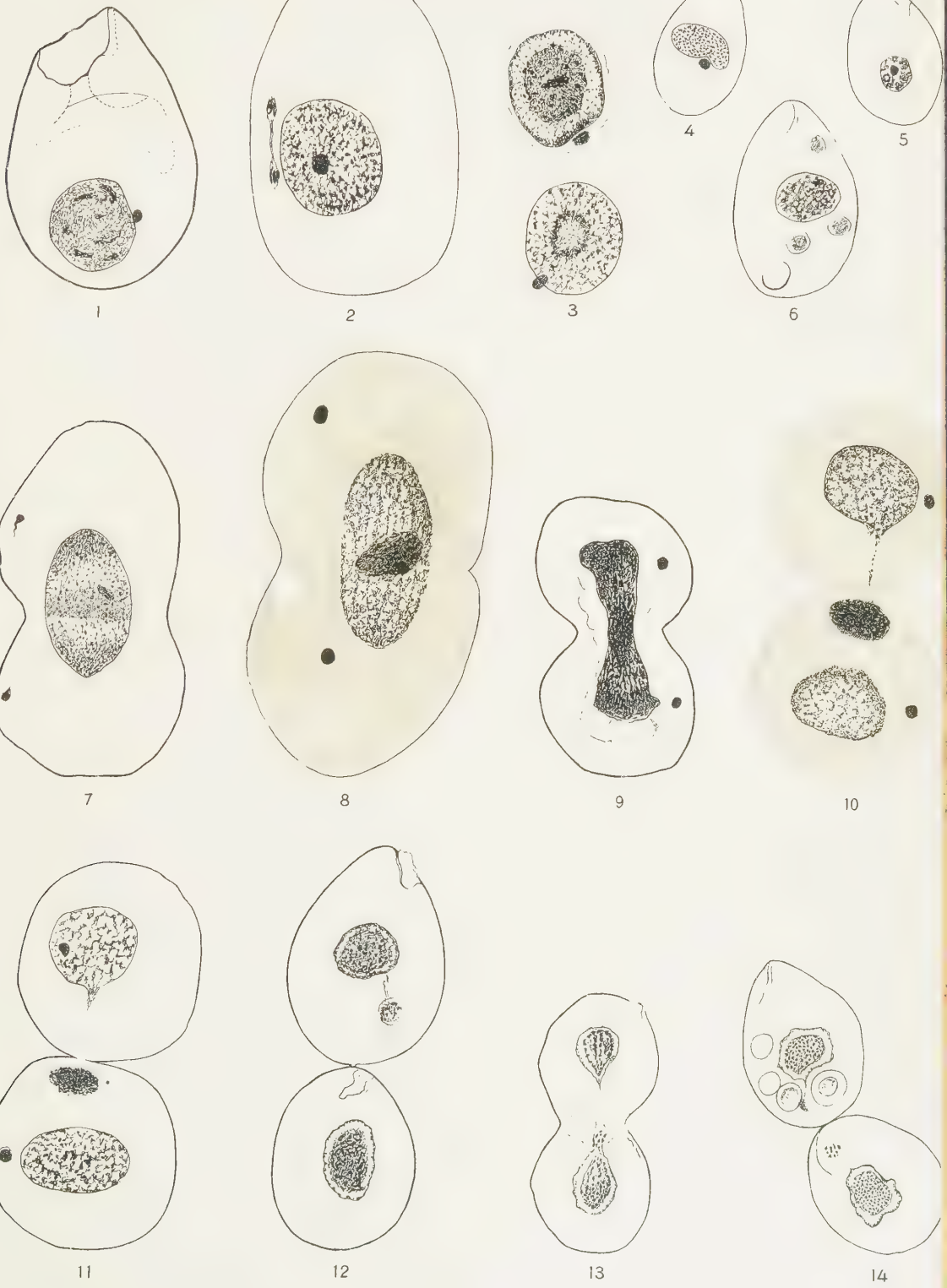
Fig. 1-2. Grosse Form von *Leucophrys patula;* in Fig. 2 Micronucleus in Teilung und Macronucleus mit Caryosom.
Fig. 3. Macro- und Micronuclei der grossen Form; erstere mit Caryosom.
Fig. 4-6. Kleine Form von *Leucophrys;* in Fig. 5 ohne Micronucleus.
Fig. 7-12. Teilung der grossen Form.
Fig. 13-14. Teilung der kleinen Form.

Estampa 6

Fig. 1-2. Fórma grande de *Leucophrys pa-*
tula; á fig. 2 vêm-se o micronucleo em
divisão e o macronucleo com carioxoma.
Fig. 3. Macro e micronucleo da fórma gran-
de; o primeiro com o carioxoma.
Fig. 4-6. Fórma pequena do *Leucophrys*; á
fig. 5 sem o micronucleo.
Fig. 7-12. Divisão da fórma grande.
Fig. 13-14. Divisão da fórma pequena.

Tafel 6

Fig. 1-2. Grosse Form von *Leucophrys pa-*
tula; in Fig. 2 *Micronucleus* in Teilung
und Macronucleus mit Caryosom.
Fig. 3. Macro- und *Micronucleï* der grossen
Form; ersterer mit Caryosom.
Fig. 4-6. Kleine Form von *Leucophrys*; in
Fig. 5 ohne *Micronucleus*.
Fig. 7-12. Teilung der grossen Form.
Fig. 13-14. Teilung der kleinen Form.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

Da pesquiza de antijeno e de anticorpo pela fixação de complemento

pelo

Dr. Arthur Moses.

Ueber den Nachweis von Antigen und Antikörper durch Komplementablenkung

von

Dr. Arthur Moses.

O diagnostico precizo e rapido das molestias infetuosas de grande alcance para fins profilaticos e terapeuticos, outrora, dependente da verificação microscopica do germen, consegue-se hoje, pesquizando os anticorpos especificos elaborados pelos microorganismos, ajentes da infeção.

A aglutinação constitue, apoz os trabalhos de GRUBER e WIDAL prova robusta de diagnostico, principalmente, nas infeções cauzadas pelos germens do grupo coli-tifo; a pesquiza de bacteriolizinas no soro dos doentes entrou para a pratica clinica com os estudos de STERN e para o diagnostico da infeção stafilococica aconselham, de longa data, BRUCK, MICHAELIS e SCHULTZE a verificação no sangue da stafiloantilizina.

Tornou-se mais lata a aplicação pratica da pesquiza de anticorpos, apoz os estudos de BORDET e GENGOU que revelaram na mór parte dos soros microbianos a prezença de produtos de reação especifica.

Não nos deteremos no estudo da natureza desses anticorpos. Na Alemanha NEUFELD que com especial cuidado estudou o assunto opina pela existencia de novo anticorpo diferente dos já descritos, creando para elle a denominação de *anticorpo* de BORDET. Em recente revista historica e critica sobre fixação de

Eine sichere und schnelle Diagnose der Infektionskrankheiten ist für prophylaktische und therapeutische Zwecke von grosser Bedeutung; während dieselbe früher vom mikroskopischen Nachweise des Erregers abhing, erreicht man sie heute durch den Nachweis der spezifischen Antikörper, welche durch die Infektionsträger hervorgerufen werden.

Seit den Arbeiten von GRUBER und WIDAL bildet die Agglutination einen wichtigen Beweis für die Diagnose, besonders bei Infektionen, welche durch Bakterien der Coli-Typhusgruppe verursacht werden; der Nachweis von Bakteriolysinen im Blutserum der Kranken wurde durch die Studien von Stern in die klinische Praxis eingeführt und BRUCK, MICHAELIS und SCHULTZE empfahlen schon vor langer Zeit für die Diagnose der Staphylocokkeninfektion das Aufsuchen des Staphyloantilysins im Blute; die praktische Anwendung des Antikörpernachweises wurde jedoch erst durch die Studien von BORDET und GENGOU verallgemeinert, da dieselben in dem grössten Teil der Mikrobiensera die Gegenwart von spezifischen Reaktionsprodukten erwiesen. Ich will mich hier nicht mit dem Studium der Natur dieser Antikörper aufhalten.

In Deutschland ist NEUFELD, welcher den Gegenstand besonders sorgfältig studirte, der Ansicht, dass ein neuer Antikörper existirt,

complemento é essa opinião contestada por BORDET que persiste em responsabilizar pelo fenomeno a que ligou o nome umanti corpo da natureza de amboceptor.

Essa determinação indireta do ajente da entidade morbida só é aplicavel nos cazos em que o organismo se acha durante algum tempo sob a ação do germen de modo a poder elaborar anticorpos, o que equivale a dizer que é limitada sua aplicação.

Necessario seria possuir um metodo biolojico, não da demonstração de anticorpos, mas da pesquiza direta do microorganismo. Para substituir os morosos processos de verificação microscopica e estudo das propriedades culturais dos germens izolados dos humores organicos deram-nos WASSERMANN e BRUCK um metodo biolojico bastante sensivel, que consiste na pesquiza direta do ajente da infeção, ou melhor, de particulas de destruição do mesmo. E' esse metodo aplicavel nos primeiros dias de infeção, quando ainda não é possivel a pesquiza de anticorpos.

Conhecido um dos elementos facil se torna ajuizar da prezença do outro tomando para indice a fixação de complemento.

Com a modificação introduzida por WASSERMANN e BRUCK na primitiva tecnica de BORDET tornou-se a reação, hoje, geralmente denominada de BORDET e GENGOU um preciozo auxiliar de diagnostico. Consiste a modificação no emprego de extratos bacterianos em logar das emulsões aconselhadas por *Bordet*.

Com o fim de nos certificarmos do valor que tem a reação para o diagnostico de molestias infetuosas realizámos uma serie de pesquizas de antijeno e anticorpo, quer em cazos clinicos quer em infeções animaes espontaneas e experimentaes.

Antes de abordarmos a aplicação pratica daremos de modo sucinto o metodo de trabalho. O complemento era fornecido por soro normal de 24 horas, conservado durante esse tempo no aparelho *Frigo* de *Morgenroth*, si bem que, tivessemos verificado no correr dos trabalhos que no *Frigo* se mantem inalteravel o soro durante 48 horas. Precedia qualwelcher von den schon beschriebenen verschieden ist und für den er die Bezeichnung «*Antikörper von Bordet*» aufgestellt hat. Diese Auffassung wird von BORDET in einer neuen, historischen und kritischen Bearbeitung der Komplementablenkung zurückgewiesen, indem er fortfährt, die nach ihm benannte Erscheinung auf einen Antikörper von Amboceptornatur zurückzuführen.

Diese indirekte Bestimmung des Krankheitserregers lässt sich nur in den Fällen anwenden, in welchen der Organismus einige Zeit unter dem Einfluss desselben gestanden hat, so dass er Antikörper bilden konnte, d. h., sie findet nur eine beschränkte Anwendung. Es wäre am Platze, eine neue biologische Methode zu finden, welche nicht zum Nachweise der Antikörper, sondern zur direkten Bestimmung des Erregers dient. Als Ersatz der zeitraubenden Prozesse, welche dem mikroskopischen Nachweise und dem Studium der Kultureigenschaften der aus den Körpersäften isolirten Keime dienen, haben WASSERMANN und BRUCK eine ziemlich empfindliche biologische Methode angegeben; dieselbe besteht in direktem Nachweis des Krankheitserregers oder richtiger der Zerstörungsprodukte derselben. Diese Methode lässt sich bereits in den ersten Krankheitstagen anwenden, wenn der Nachweis des Antikörpers noch nicht möglich ist.

Wenn das eine Element bekannt ist, so lässt sich die Gegenwart des anderen leicht beurteilen, indem man die Komplementablenkung zum Nachweise benützt. In der von WASSERMANN und BRUCK eingeführten Modification der ursprünglichen BORDET'schen Technik bildet heute die, gewöhnlich nach BORDET und GENGOU benannte, Reaktion, ein wertvolles Hilfsmittel für die Diagnose. Die Modification besteht in der Anwendung von Bacterienextrakten an Stelle der von BORDET empfohlenen Emulsionen.

Um mich von der Bedeutung zu überzeugen, welche die Reaktion für die Diagnose der Infektionskrankheiten besitzt, führte ich eine Reihe von Antigen- und Antikörper-Untersuchungen aus und zwar sowohl in klinischen Krankheitsfällen, als auch bei spontanen und experimentellen Tierinfektionen.

quer ensaio a dozajem do soro hemolitico e do complemento e a verificação da quantidade de antijeno ou de humor organico em que existia anticorpo que exercia sobre o sistema hemolitico ação impediente de modo a não exceder nas experiencias a metade dessa quantidade.

Do preparo do antijeno diremos mais por miudo a propozito de cada infeção estudada; podemos aqui adiantar que do emprego comparativo das emulsões e dos extratos bacterianos concluimos que não era necessario empregar elevadas quantias de emulsão nos cazos em que fôra suficiente um minimo de extrato; a vantajem da tecnica de WASSERMANN e BRUCK consiste na possibilidade de obter rezultados quantitativos pelo emprego de antijeno de valor quazi constante.

Terminados os ensaios previos, é possivel investir os dois problemas que se oferecem na fixação de complemento: pesquiza de antijeno e de anticorpo.

Eram os ensaios realizados em tubos de 5 cm. de altura e 1 de diametro colocados em suporte lastrado dentro de um termostato do tipo OSTWALD, em que um termoregulador de mercurio mantem constante a temperatura de 37º. Consoante a tecnica seguida pela maioria dos pesquizadores realizamos cada ensaio em 3 horas (1 hora de absorção e 2 de hemolize). Convencionamos traduzir pelos sinais —, +, + +, + + + o rezultado das experiencias; — indica auzencia de hemolize; + denota sombra de hemolize; + + indica hemolize incompleta e + + + hemolize total.

Rezumem-se em 9 cazos de infeção tifica, 38 de peste e 3 de dizenteria bacilar os cazos clinicos em que aplicamos a reação de BORDET.

Dos 9 cazos de infeção tifica foi quatro vezes o diagnostico confirmado pela cultura do bacilo, em um cazo izolado das fezes, em outro do sangue, em um terceiro do sangue e da urina e finalmente em um quarto do baço em autopsia.

Em duas das quatro observações citadas concorreu ainda para firmar o diagnostico a

Bevor ich auf die praktische Anwendung eingehe, beschreibe ich kurz die angewandte Methode:

Das Komplement wurde von 24 Stunden altem Normalserum geliefert; dasselbe wurde, während der angegebenen Zeit, im Apparat «*Frigo*» von MORGENROTH aufbewahrt; übrigens habe ich im Laufe der Arbeit festgestellt, dass das Serum sich im «*Frigo*»-Apparate auch während 48 Stunden unverändert erhält. Vor jedem Versuche wurde hämolytisches Serum und Komplement dosirt und die Menge von Antigen oder antikörperhaltiger Organflüssigkeit festgestellt, welche auf das hämolytische System keine hindernde Wirkung ausübte, wobei jedoch im Versuche die Hälfte dieser Menge nicht überschritten wurde.

Auf die Herstellung des Antigens werde ich bei den einzelnen untersuchten Infektionen näher eingehen; ich schicke nur voraus, dass die vergleichsweise Anwendung der Emulsionen und Bakterienextrakte mich überzeugte, dass man keine grossen Emulsionsmengen anzuwenden braucht, wo ein Minimum von Extrakt genügt; der Wert der WASSERMANN und BRUCK'schen Technik besteht vielmehr in der Möglichkeit, quantitative Resultate durch Anwendung eines Antigens von nahezu konstantem Werte zu erhalten. Nach Abschluss der Vorversuche kann man die zwei Probleme angehen, welche sich bei der Komplementablenkung darbieten, nähmlich das Aufsuchen des Antigens und dasjenige des Antikörpers. Die Versuche wurden in Glasröhrchen von 1 cm. Durchmesser und 5 cm. Höhe ausgeführt; dieselben wurden in einem zweckmässigen Ständer in einen OSTWALD'schen Thermostaten gebracht, in welchem ein Quecksilberregulator eine konstante Temperatur von 37° erhielt. Bei der in der Mehrzahl der Fälle angewandten Technik nahm jeder Versuch drei Stunden in Anspruch (eine für die Absorption und zwei für die Hämolyse). Die Resultate der Versuche werden durch die konventionellen Zeichen: —, +, + +, + + + ausgedrückt; — bedeutet Fehlen der Hämolyse; + eine Spur derselben, + + unvollständige, + + + totale Hämolyse.

Die klinischen Fälle, bei denen ich die

reação de WIDAL. Nos cinco observandos restantes confirmámos pelo rezultado pozitivo da aglutinação o diagnostico clinico.

Seis vezes verificamos a prezença de anticorpo e duas a de antijeno. Se por um lado verificámos antijeno em doente em que foi negativa a hemocultura, em dous outros em que foi pozitiva essa prova não revelou o ensaio a prezença do ajente da infeção.

Sobreleva entre as observações a primeira, que mais tempo ocupará nossa atenção. A presença do anticorpo de BORDET verificada no soro na auzencia de aglutininas, embora, seja fato digno de rejistro não constitue o lado mais interessante dessa observação.

HIRSCHFELD e NEUFELD em estudos anteriores tinham já assinalado a precocidade de formação do anticorpo de BORDET.

Não foi ainda o que nos chamou a atenção para esse cazo a prezença de antijeno no sangue cuja cultura rezultou esteril. A sensibilidade da reação constitue explicação suficiente d'este fato.

Acreditamos sumamente interessante essa observação pela prezença simultanea de antijeno e anticorpo verificada no soro de um mesmo doente e do qual não conhecemos em literatura outro exemplo.

A explicação, que pudemos encontrar para esse fato é a não corespondencia dos antijenos e anticorpos pesquizados. Outra explicação seria o estabelecimento de equilibrio quimico no qual além da combinação antijeno + anticorpo restaria livre uma certa quantidade desses elementos que teriam entrado em combinação por ocazião de nova adição de antijeno ou anticorpo, permitindo assim nova prisão de complemento.

A essa observação referem-se os quadros 1 e 2.

BORDET'sche Reaktion anwandte, bestehen aus 9 Typhus-, 38 Pest- und 3 Dysenterie-Fällen (letztere von bacillärer Form). Von den 9 Typhusinfektionen wurde bei vieren die Diagnose durch Kultur des Bacillus erwiesen, welcher einmal aus Fäces, ein anderes Mal aus dem Blute, ein drittes Mal aus Blut und Urin und endlich ein viertes Mal bei der Autopsie aus der Milz isolirt wurde. In 2 dieser 4 Fälle trug auch die WIDAL'sche Reaktion zur Bestätigung der Diagnose bei. In den übrigen 5 Beobachtungen wurde die klinische Diagnose durch positives Ausfallen der Agglutination bestätigt.

Sechsmal konstatirte ich das Vorkommen des Antikörpers und zweimal die Gegenwart von Antigen. Während ich bei einem Kranken, bei welchem die Hämokultur negativ blieb, Antigen nachwies, war diese in zwei anderen Fällen positiv, obwohl die Untersuchung die Gegenwart des Krankheitserregers nicht anzeigte; von diesen Beobachtungen fällt die erste besonders auf und soll unsere Aufmerksamkeit etwas länger beschäftigen. Der Nachweis des Vorkommens des Antikörpers von BORDET im Serum bei fehlendem Agglutinin ist zwar erwähnenswert, bildet jedoch nicht die interessanteste Seite der Beobachtung. HIRSCHFELD und NEUFELD hatten schon bei früheren Untersuchungen die frühzeitige Bildung des Antikörpers von BORDET angegeben. Auch die Gegenwart des Antigens im Blute, dessen Kultur steril blieb, fiel mir nicht besonders auf, da die Empfindlichkeit der Reaktion dies genügend erklärt. Was ich dagegen bei dieser Beobachtung für besonders interessant halte, ist das gleichzeitige Vorkommen von Antigen und Antikörper bei der Untersuchnng des Blutes von einem und demselben Patienten, wovon ich in der Litteratur kein anderes Beispiel kenne.

Die Erklärung dieser Tatsache kann man darin suchen, dass die gefundenen Antigene und Antikörper sich nicht entsprechen. Eine andere Erklärung wäre die Herstellung eines chemischen Gleichgewichtes, bei welchem neben der Verbindung Antigen + Antikörper eine gewisse Menge dieser Elemente frei bliebe, welche sich bei einem neuen Zusatze von Antigen oder Antikörper verbinden und so eine neue Komplementbindung ermöglichen können.

Quadro 1

2 horas a 37°

1 hora a 37°						
Soro antitífico de cabra, inativado	Soro de doente, inativado	Soro normal humano, inativado	Complemento: Soro de cabra	Soro de cabra × carneiro	Globulos de carneiro a 5 %	Rezultado
0,04	0,1	—	0,1	0,1	1 cc	
»	0,06	- -	»	»	»	
»	0,04	—	»	»	»	
»	0,02	—	»	»	»	
»	0,01	-	»	»	»	
»	0,005	—	»	»	»	
»	—	0,1	»	»	»	
»	- -	0,06	»	»	»	
»	—	0,04	»	»	»	
»		0,02	»	»	»	
»		0,01	»	»	»	
»		0,005	»	»	»	
0,08	—	—	»	»	»	
—	0,2	—	»	»	»	
—		0,2	»	»	»	
—		—	»	»	»	
—		-	»	»	»	
—	—	- -	—	—	»	

Auf diese Beobachtung beziehen sich die Tabellen 1 und 2.

Tafel 1 **2 Stunden auf 37°**

1 Stunde auf 37°						
Inaktivirtes antityphisches Ziegenserum	Inaktivirtes Krankenserum	Inaktivirtes menschliches Normalserum	Komplement: Ziegenserum	Ziegen Hammelblutserum	5 % Hammelblutkörperchen	Resultat
0,04	0,1	- -	0,1	0,1	1 cc	—
»	0,06		»	»	»	—
»	0,04	—	»	»	»	—
»	0,02	—	»	»	»	+
»	0,01		»	»	»	+
»	0,005	—	»	»	»	+
»	—	0,1	»	»	»	+
»	—	0,06	»	»	»	+
»	—	0,04	»	»	»	+
»	- -	0,02	»	»	»	+
»	- -	0,01	»	»	»	+
»	- -	0,005	»	»	»	+
0,08	—	—	»	»	»	+
—	0,2		»	»	»	+
—	—	0,2	»	»	»	+
—	- -		- -	»	»	+
—	—	—	—	—	»	—

Quadro 2

2 horas a 37°

1 hora a 37°						
Extrato de bacilo tífico	Soro de doente, inativado	Soro normal humano, inativado	Complemento: Soro de cabra	Soro de cabra × carneiro	Globulos de carneiro a 5 %	Rezultado
0,1	0,1		0,1	»	»	—
»	0,06	-	»	»	»	—
»	0,04	-	»	»	»	—
»	0,02	-	»	»	»	+
»	0,01	-	»	»	»	+
»	0,005	—	»	»	»	+
»	- -	0,1	»	»	»	+
»		0,06	»	»	»	+
»		0,04	»	»	»	+
»		0,02	»	»	»	+
»		0,01	»	»	»	+
»	-	0,005	»	»	»	+
0,2	—	—	»	»	»	+
—	0,2	—	»	»	»	+
—		0,2	»	»	»	+
—	-	—	»	»	»	+
—	—	—	—	—	»	—

Tafel 2 **2 Stunden auf 37°**

1 Stunde auf 37°						
Typhusbacillen-Extract	Inaktivirtes Krankenserum	Inaktivirtes menschliches Normalserum	Komplement: Ziegenserum	Ziegen Hammelblutserum	5 % Hammelblutkörperchen	Resultat
0,1	0,1	—	0,1	0,1	1 cc	—
»	0,06	-	»	»	»	—
»	0,04	- -	»	»	»	—
»	0,02	-	»	»	»	+
»	0,01		»	»	»	+
»	0,005	—	»	»	»	+
»	-	0,1	»	»	»	+
»	-	0,06	»	»	»	+
»	-	0,04	»	»	»	+
»	-	0,02	»	»	»	+
»	—	0,01	»	»	»	+
»	- -	0,005	»	»	»	+
0,2	—	-	»	»	»	+
—	0,2	—	»	»	»	+
—	—	0,2	»	»	»	+
—	—	—	—	—	»	—

Em 3 doentes do Hospicio Nacional de Alienados, cujo diagnostico clinico foi em um cazo confirmado pela cultura de fezes, que nos forneceram um bacilo dizenterico do tipo Shiga-Kruse e em dous outros pela aglutinação, aplicamos a reação de BORDET.

Empregando em um cazo uma emulsão de bacilos do tipo *Shiga-Kruse* foi positva a reação; nos dous outros utilizamos-nos de uma emulsão de bacilos do tipo *Flexner*, sendo em um cazo positivo e em outro negativa a reação.

Dada a pequena quantidade de sangue que pudemos colher não nos foi possivel verificar a questão controversa da especificidade dos anticorpos para cada qual dos escantilhões de bacilo dizenterico. Em trabalho cuidadozo por DOPTER publicado em 1905 é essa especificidade negada.

Ao diagnostico clinico da peste procurámos aplicar a reação que vimos estudando, aproveitando uma serie de cazos recolhidos ao Hospital de Izolamento de S. Sebastião.

Além dos primitivos estudos de BORDET que verificou no soro antipestozo de cavalo a prezença de sensibilizadora especifica só conhecemos neste assunto os trabalhos de STRONG que, em Manilha, lançou mão da fixação de complemento para avaliar do gráo de imunidade conferida pela vacina antipestoza e de G. FORNARIO que, no Instituto Pasteur de Paris, verificou a prezença de anticorpo no soro de cobaias vacinadas por via retal e em outros que tinham ingerido *per os* bacilos mortos pelo aquecimento a 60º. Esses anticorpos ainda eram pesquizaveis cinco mezes apoz a inoculação.

Em larga serie de 38 cazos clinicamente diagnosticados, dos quais 32 confirmados bacteriolojicamente duas vezes assinalámos a prezença de antijeno e 25 a de anticorpo. Em onze cazos foi negativa a reação. Nos dous doentes em que conseguimos pesquizar antijeno no soro a hemocultura nos deu a indicação de tratar-se de cazos de septicemia pestoza. Na pesquiza de anticorpos empregámos como antijeno a emulsão bacilar que serve para preparo da vacina antipestoza de

Ich versuchte die BORDET'sche Reaktion bei 3 Patienten der hiesigen Irrenanstalt, bei welchen die klinische Diagnose einmal durch Isolirung eines Dysenteriebacillus vom Typus SHIGA-KRUSE aus den Fäces und zweimal durch die Agglutination bestätigt wurde. In einem Falle erhielt ich ein positives Resultat der Reaktion bei Anwendung einer Emulsion von SHIGA-KRUSE'schen Bacillen; in den beiden anderen benutzte ich Bacillen vom Typus FLEXNER, wobei die Reaktion einmal positiv und das andere mal negativ ausfiel.

Bei der geringen Blutmenge, die ich entnehmen konnte, war es mir nicht möglich, die Streitfrage über die Specifität der Antikörper für die beiden Dysenteriebacillenformen zu unterscheiden. In einer sorgfältigen, im Jahre 1905 veröffentlichten Arbeit von DOPTER wird die Spezifität in Abrede gestellt.

Die von mir studirte Reaktion suchte ich auch auf die klinische Diagnose anzuwenden, wobei ich eine Serie von Fällen aus dem hiesigen Isolirhospital (S. Sebastião) benutzte.

Abgesehen von den ursprünglichen Untersuchungen von BORDET, welcher in antipestösem Pferdeserum die Gegenwart eines spezifischen Antikörpers nachwies, kenne ich über diesen Gegenstand die Arbeit von STRONG, der in Manilla die Komplementablenkung anwandte, um den durch die antipestöse Impfung bewirkten Immunitätsgrad festzustellen. Dazu kommt noch die Arbeit von FORNARIO aus dem «Institut Pasteur» in Paris, welcher den Antikörper im Blutserum von Meerschweinchen nachwies; letztere waren teils *per rectum* geimpft, teils hatten sie *per os* durch Erhitzung auf 60° abgetötete Bacillen aufgenommen. In einer Serie von 38 klinisch diagnostizirten Fällen, unter welchen 32 mit bakteriologischem Nachweis des Erregers, erkannte ich zweimal die Gegenwart von Antigen und 25 mal die des Antikörpers. In 11 Fällen war das Resultat der Reaktion ein negatives. Bei 2 Patienten, deren Serum Antigen erkennen liess, zeigte die Blutkultur, dass es sich um septikämische Pest handelte. Bei der Untersuchung auf Antikörper verwandte ich als Antigen die Bacillenemulsion, welche in Manguinhos zur Herstellung der antipes-

Manguinhos cujo preparo vem descrita em trabalho desse Instituto por A. Fontes em 1903.

Na maioria das observações retiramos sangue no 5.º dia de molestia; forneceram alguns material no 8.º e 9.º dia de enfermidade. Cumpre assinalar, entretanto, quatro doentes que no terceiro dia de molestia nos deram rezultado pozitivo. Ainda assim não é dificil explicar esses rezultados para quem conhece o tempo de incubação da molestia que é na media de 3—5 dias. Este periodo póde variar dentro de grandes limites, desde algumas horas (peste fulminante) até cerca 5 a 15 dias.

Na impossibilidade de aqui reproduzir os quadros referentes a todas as observações daremos uma pesquiza de antijeno e outra de anticorpo, sendo essa de um doente no 7.º dia de molestia. (Quadros 3 e 4).

tösen Vaccine dient, wie sie 1903 in einer Arbeit dieses Institutes von A. Fontes beschrieben wurde. In der Mehrzahl der Beobachtungen entnahm ich das Blut am fünften Krankheitstage, bei einigen anderen stammte das Material vom achten bis neunten Tage der Erkrankung; doch müssen auch 4 Patienten erwähnt werden, welche am dritten Krankheitstage mit positivem Resultate untersucht wurden. Im übrigen sind diese Ergebnisse nicht schwer zu verstehen, wenn man die Incubation der Krankheit, im Mittel 3 bis 5 Tage, berücksichtigt. Letztere Periode schwankt innerhalb weiter Grenzen, von einigen Stunden (bei fulminirenden Fällen), bis zu einer Frist von 5 bis 15 Tagen. Da es mir nicht möglich ist, die auf sämtliche Beobachtungen bezüglichen Tabellen zu reproduziren, gebe ich eine Untersuchung auf Antigen und eine auf Antikörper wieder, wobei die letztere von einem Patienten am 7. Krankheitstage stammt. (Tabellen 3 und 4).

Quadro 3

2 horas a 37°

1 hora a 37°							1 Stunde auf 37°						
Soro antipestozo de cavalo, inativado	Soro de doente, inativado	Soro normal humano, inativado	Complemento: Soro de cobaia	Soro de cobaia × coelho	Globulos de coelho 5 %	Rezultado	Inaktivirtes antipestöses Pferdeserum	Inaktivirtes Krankenserum	Inaktivirtes menschliches Normalserum	Komplement: Meerschweinchenserum	Meerschweinchen-Kaninchenblutserum	5 % Kaninchenblutkörperchen	Resultat
0,2	0,2	—	0,15	0,01	1 cc	—	0,2	0,2	—	0,15	0,01	1 cc	—
»	0,1	—	»	»	»	—	»	0,1	—	»	»	»	—
»	0,05	—	»	»	»	+	»	0,05	—	»	»	»	+
»	0,03	—	»	»	»	+ +	»	0,03	—	»	»	»	+ +
	0,01	—	»	»	»	+ + +	»	0,01	—	»	»	»	+ + +
	0,005	—				+ + +	»	0,006					+ + +
»	—	0,2	»	»	»	+ +	»	—	0,2	»	»	»	+ +
»	—	0,1	»	»	»	+ + +	»	—	0,1	»	»	»	+ + +
»	—	0,05	»	»	»	+ + +	»	—	0,05	»	»	»	+ + +
»	—	0,03	»	»	»	+ + +	»	—	0,03	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +	»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +	»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,4	—	—	»	»	»	+ + +	0,4	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,4	—	»	»	»	+ + +	—	0,4	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,4	»	»	»	+ + +	—	—	0,4	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +	—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tafel 3

2 Stunden auf 37°

Quadro 4

2 horas a 37°

1 hora a 37°						
Emulsão de bacilos da peste mortos pelo calor	Soro de doente, inativado	Soro normal humano, inativado	Complemento: Soro de cobaia	Soro de cobaia × coelho	Globulos de coelho 5 %	Rezultado
0,02 mg	0,1	—	0,1	0,01	1 cc	—
»	0,08	—	»	»	»	—
»	0,05	—	»	»	»	—
»	0,03	—	»	»	»	—
»	0,01	—	»	»	»	+
»	0,005	—	»	»	»	+ + +
»	—	0,1	»	»	»	+
»	—	0,08	»	»	»	+
»	—	0,05	»	»	»	+ +
»	—	0,03	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,04 mg	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
»	»	»	»	»	»	—
—	—	—	—	—	»	—

Tafel 4

2 Stunden auf 37°

1 Stunde auf 37°						
Durch Hitze getötete Pestbacillen Emulsion	Inaktivirtes Krankenserum	Inaktivirtes menschliches Normalserum	Komplement: Meerschweinchenserum	Meerschweinchen-Kaninchenblutserum	5 % Kaninchenblutkörperchen	Resultat
0,02 mg	0,1	—	0,1	0,01	1 cc	—
»	0,08	—	»	»	»	—
»	0,05	—	»	»	»	—
»	0,03	—	»	»	»	—
»	0,01	—	»	»	»	+
»	0,005	—	»	»	»	+ + +
»	—	0,1	»	»	»	+
»	—	0,08	»	»	»	+
»	—	0,05	»	»	»	+ +
»	—	0,03	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,04 mg	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
»	»	»	»	»	»	—
—	—	—	—	—	»	—

Não nos iludimos quanto á aplicação clinica da fixação de complemento em qualquer das 3 infeções estudadas. A complexa tecnica do metodo biolojico de que se trata não permitirá, sem duvida, que ella venha, por ora, substituir a hemocultura e a prova de WIDAL.

Abandonando as infeções bacterianas interessou-nos estudar a aplicação que poderia ter essa nova aquizição dos modernos estudos de imunidade em infeções cauzadas por espiroquetas e clamidozoarios.

Em vasto numero de cazos de sifilis, paralizia geral e tabes verificámos a reação de WASSERMANN. Não se tratando nessa infeção de pesquiza de anticorpo e sim de reação quimica de natureza ainda não desvendada não nos deteremos aqui no estudo do assunto.

Melhor campo nos oferecia, sem duvida, a espiroquetose das galinhas onde, ao contrario do que se observa na sifilis, o virus existe em abundancia no sangue.

Datam de 1908 os estudos de MANTEUFEL; até então só eram conhecidos no soro de ga-

Ueber die klinische Verwendbarkeit der Komplementablenkung bei den 3 verschiedenen von mir studirten Infektionen mache ich mir keine Illusionen. Die komplizirte Technik der betreffenden biologischen Methoden wird sicherlich nicht gestatten, dass sie zur Zeit die Blutkultur und den WIDAL'schen Versuch ersetzen könnten.

Abgesehen von Bakterieninfektionen, schien mir von Interesse zu untersuchen, inwiefern sich diese neue Errungenschaft der Immunitätsstudien auch bei den durch Spirochäten und Chlamydozoen hervorgerufenen Infektionen anwenden liesse.

Ich habe die WASSERMANN'sche Reaktion bei sehr zahlreichen Fällen von Syphilis, allgemeiner Paralyse und Tabes untersucht. Da es sich dabei nicht um den Nachweis eines Antikörpers, sondern um eine, in ihrer Natur noch nicht erklärte, chemische Reaktion handelt, will ich mich hier nicht mit dem Studium dieses Gegenstandes aufhalten.

Ein besseres Beobachtungsfeld dürfte zweifellos die Spirochätose der Hühner bieten,

linhas imunes: aglutininas e anticorpos paraziticidas.

MANTEUFEL empregou como antijeno sangue seco pulverizado em suspensão em solução fiziolojica, extratos de orgãos e de sangue de galinhas varias vezes inoculadas com espiroquetas. Veríficou assim a prezença de anticorpos especificos no soro de galinhas imunes em todas as experiencias em que trabalhava com extrato sanguineo.

Encetando os estudos sobre antijeno e anticorpo na espiroquetoze das galinhas preparámos o imunisoro como o fizera MANTEUFEL, fazendo repetidas inoculações de sangue rico em espiroquetas em galinhas que tinham rezistido á infeção experimental; diverjimos, entretanto, desse pesquizador no modo de preparar o antijeno.

Substituimos o extrato sanguineo pelo soro de galinha no 3.º ou 4.º dia de infeção, ocazião em que aumenta o numero de espiroquetas na circulação geral.

Inativamos o imunisoro e o soro de galinha infetada e assim conseguimos pesquizar antijeno no soro emquanto o exame microscopico revelava a presença do microorganismo no sangue.

Ao dezaparecer o germen da circulação periferica tornou-se possivel a pesquiza de anticorpos que, então, se mantem no soro durante largo espaço de tempo. (Quadros 5 e 6).

Entre as infeções cauzadas por clamidozoarios ocuparam nossa atenção as infeções vacinica, variolica, rabica, tracomatoza, o epitioma contajiozo dos pombos e a peste das galinhas.

Compreendendo o grande alcance que poderá ter para a imunidade conferida pela vacida, assim como para o diagnostico da variola, com grande empenho pesquizámos nessas duas infeções a formação de anticorpos.

Na vacina como na variola é questão de não pequena importancia a da circulação do virus no organismo. Longamente debatida ainda não concordaram sobre esse assunto os pesquizadores. Admitida por PFEIFFER, REITER, FROSCH, FREYER, SIEGEL, v. WASIELEWSKI e

bei welcher im Gegensatze zur Syphilis das Virus reichlich im Blute gefunden wird. Bis zu den Studien von MANTEUFEL (1908) kannte man im Serum der immunisirten Hühner nur Agglutinine und parasitizide Antikörper. MANTEUFEL verwandte als Antigen getrocknetes, zerriebenes und in physiologischer Salzlösung suspendirtes Blut, ausserdem Extrakte aus den Organen und dem Blute von Hühnern, die mehrmals mit Spirochäten geimpft waren. Auf diese Weise konstatirte er die Gegenwart von spezifischen Antikörpern im Blute von immunisirten Hühnern bei allen Versuchen, in welchen Blutextrakt angewandt wurde. Bei meinen Versuchen über Antigene und Antikörper bei Spirochätose der Hühner stellte ich das Immunserum auf dieselbe Weise her, indem ich wiederholt an Spirochäten reiches Blut auf Hühner verimpfte, welche der experimentellen Infektion widerstanden hatten; dagegen wich ich von MANTEUFEL bei der Herstellung des Antigens ab. Ich ersetzte nähmlich das Blutextrakt durch Hühnerserum vom dritten und vierten Infektionstage, an welchen die Zahl der Spirochäten in zirkulirendem Blute zunimmt. Ich inaktivirte das Immunserum und das Serum von infizirten Hühnern und es gelang mir so, Antigen im Serum nachzuweisen, solange die mikroskopische Untersuchung die Gegenwart der Parasiten im Blute ergab. Nach Verschwinden derselben aus der peripherischen Circulation war es möglich, die Antikörper nachzuweisen, welche sich dann während langer Zeiträume im Serum erhalten. (Tabellen 5 und 6).

Von den Infektionen durch Chlamydozoen dienten mir zur Untersuchung Vaccine, Variola, Hydrophobie, Trachom, Epithelioma contagiosum der Tauben und Hühnerpest.

In Berücksichtigung der grossen Bedeutung, welche die Bildung der Antikörper für die Vaccinimmunität und die Diagnose der Pocken haben könnte, forschte ich bei beiden Infektionen sehr eifrig nach derselben.

Bei der Vaccine und Variola ist die Frage der Circulation des Virus im Organismus von nicht geringer Bedeutung. Trotz langer Debatte haben sich die Forscher auf diesem Gebiete noch nicht geeinigt. Während die-

Quadro 5

2 horas a 37°

1 hora a 37°

Imunisoro	Soro de galinha infetada (3.o dia de infeção)	Soro de galinha normal	Complemento: soro de cobaia 1:10	Soro de coelho × carneiro 1:100	Globulos de carneiro 5 %	Rezultado
0,1	0,1		1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,05		»	»	»	—
»	0,03		»	»	»	—
»	0,01		»	»	»	+ +
»	0,005		»	»	»	+ + +
»		0,1	»	»	»	+ + +
»		0,05	»	»	»	+ + +
»		0,03	»	»	»	+ + +
»		0,01	»	»	»	+ + +
»		0,005	»	»	»	+ + +
0,2			»	»	»	+ + +
	0,2		»	»	»	+ + +
		0,2	»	»	»	+ + +

Tafel 5

2 Stunden auf 37°

1 Stunde auf 37°

Immunserum	Infizirtes Hühnerserum (3. Tag nach der Infektion)	Normales Hühnerserum	Komplement: Meerschweinchenserum 1:10	Kaninchen-Hammelblutserum 1:100	5 % Hammelblutkörperchen	Resultat
0,1	0,1		1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,05		»	»	»	—
»	0,03		»	»	»	—
»	0,01		»	»	»	+ +
»	0,005		»	»	»	+ + +
»		0,1	»	»	»	+ + +
»		0,05	»	»	»	+ + +
»		0,03	»	»	»	+ + +
»		0,01	»	»	»	+ + +
»		0,005	»	»	»	+ + +
0,2			»	»	»	+ + +
	0,2		»	»	»	+ + +
		0,2	»	»	»	+ + +

Quadro 6

2 horas a 37°

1 hora a 37°

Soro de galinha doente (3.o dia de infeção)	Soro de galinha (2 dias depois da crize)	Soro de galinha normal	Complemento: soro de cobaia 1:10	Soro de coelho × carneiro 1:100	Globulos de carneiro 5 %	Rezultado
0,1	0,1		1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,05	—	»	»	»	—
»	0,03	—	»	»	»	+ + +
»	0,01	—	»	»	»	+ + +
»	0,005		»	»	»	+ + +
»	—	0,1	»	»	»	+ + +
»	—	0,05	»	»	»	+ + +
»	—	0,03	»	»	»	+ + +
»		0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,2	—	—	»	»	»	+ + +
	0,2	—	»	»	»	+ + +
	—	0,2	»	»	»	+ + +

Tafel 6

2 Stunden auf 37°

1 Stunde auf 37°

Krankes Hühnerserum (3. Infektionstag)	Hühnerserum (2 Tage nach der Krisis)	Normales Hühnerserum	Komplement: Meerschweinchenserum 1:10	Kaninchen-Hammelblutserum 1:100	5 % Hammelblutkörperchen	Resultat
0,1	0,1		1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,03	—	»	»	»	—
»	0,05	—	»	—	—	+ + +
»	0,01	—	»	—	—	+ + +
»	0,005	—	»	—	—	+ + +
»	—	0,1	»	—	—	+ + +
»	—	0,03	»	—	—	+ + +
»	—	0,05	»	—	—	+ + +
»	—	0,01	»	—	—	+ + +
»	—	0,005	»	—	—	+ + +
0,2	—	—	»	—	—	+ + +
	0,2	—	»	—	—	+ + +
	—	0,2	»	—	—	+ + +

ALDERSHOFF que registram a formação de pustulas vacinicas em creanças vacinadas com sangue e extrato organico de vitelos imunizados é ella negada por CALMETTE e GUERIN, v. PROWAZEK, PASCHEN, HAALAND, HAUSER, JÜRGENS, MÜHLENS, e HARTMANN, NOBL, HALBERSTAEDTER e ZÜPFLE.

Si na vacina ainda existem duvidas a este respeito, na variola duvida não pode haver sobre a pasajem do virus na circulação geral.

Parece, entretanto, que é em quantidade relativamente pequena que o virus variolico passa no sangue, depozitando-se rapidamente nas celulas. Nem outra concluzão se poderá tirar do grande numero de vacinações negativas em dorso e cornea de coelho com sangue e extrato de baço, rim e figado de doentes falecidos de variola hemorajica e confluente. (v. PROWAZEK e H. ARAGÃO).

Na vacina JOBLING e CASAGRANDI registram rezultados positivos e HELLER TOMARKIN e BERMBACH rezultados negativos nos ensaios de fixação de complemento.

Merecem especial menção os recentes estudos de BERMBACH que alem dos ensaios em cobaias e coelhos vacinados e submetidos a inoculações subcutaneas de linfa glicerinada tambem se ocupou da pesquiza *in anima nobili*. Em 18 individuos vacinados e revacinados nem uma vez revelou no soro a prezença de anticorpos para virus vacinico. Não se limitou esse autor a pesquizar no soro o produto de reação especifica, estendeu aos extratos splenico e hepatico seu campo de ação.

Em coelhos e em um vitelo fizemos nossos estudos. Foram os coelhos tres vezes inoculados com 1 cc de linfa glicerinada colhida de vitelo vacinado no Instituto de Manguinhos. As inoculações eram separadas por intervalos de sete dias e, oito dias apoz a ultima inoculação, procedemos á sangria.

Quanto ao vitelo depois de imunizado fizemos uma inoculação por via subcutanea de linfa colhida no quinto dia e 3 outras intravenosas de 1, 3 e 4 cc de linfa glicerinada. Oito dias apoz a ultima inoculação sangramos o animal na veia jugular.

selbe von PFEIFFER, REITER, FROSCH, FREYER, SIEGEL, v. WASIELEWSKI und ALDERSHOFF zugegeben wird (unter Anführung der Bildung von Vaccinepusteln bei Kindern, die mit Blut und Organextrakt von immunisirten Kälbern geimpft waren), wird dieselbe von CALMETTE und GUÉRIN, v. PROWAZEK, PASCHEN, HAALAND, HAUSER, JÜRGENS, MÜHLENS und HARTMANN, NOBL, HALBERSTÄDTER und ZÜPFLE verneint. Wenn hierüber bei der Vaccine noch Zweifel herrschen, so kann bei der Variola das Vorkommen des Virus in der allgemeinen Circulation nicht bezweifelt werden.

Es scheint jedoch, dass das Variolavirus in verhältnismässig kleiner Menge ins Blut übertritt und sich rasch in den Zellen ablagert. Die zahlreichen negativen Impfungen auf Rücken und Cornea des Kaninchens mit Blut, sowie mit Milz- und Leberextrakt von an hämorrhagischer und confluirender Variola Gestorbenen (v. PROWAZEK und H. ARAGÃO) gestatten keinen anderen Schluss.

Bei Versuchen über Komplementablenkung geben JOBLING und CASAGRANDI positive, HELLER, TOMARKIN und BERMBACH negative Resultate an. Besondere Erwähnung verdienen die neuerdings gemachten Studien von BERMBACH, welcher ausser Versuchen mit Meerschweinchen und Kaninchen, die nach der Impfung mit subkutanen Injektionen von Glycerinlymphe behandelt wurden, auch Untersuchungen *in anima nobili* vornahm. Bei 18 Geimpften und Revaccinirten endeckte er auch nicht einmal im Serum Antikörper gegen das Vaccinevirus. Auch beschränkte dieser Autor sich nicht auf das Aufsuchen des spezifischen Reaktionsproduktes im Serum, sondern zog auch Milz- und Leberextract in das Gebiet seiner Forschungen.

Ich machte meine Studien bei Kaninchen und einen Kalbe. Erstere wurden dreimal mit Glycerinlymphe geimpft, welche von einem im Institut von Manguinhos geimpften Kalbe herrührte. Die einzelnen Impfungen waren durch einen Zeitraum von 7 Tagen getrennt und 8 Tage nach der letzten fand die Blutentnahme statt.

Beim Kalbe machte ich nach der Immunisirung eine subkutane Einspritzung von Lymphe

Para preparo do antijeno empregámos a seguinte tecnica: em gral de porcelana trituramos durante 20-30 minutos linfa recente; depois de 10-12 horas de ajitação levamol-a a centrifugo de grande velocidade; desse modo obtivemos um liquido claro sem corpusculo em suspensão e que devia conter virus vacinico.

Em todos os ensaios, quer fosse o complemente de cobaia, coelho, cabra ou vitelo, foram negativos os rezultados.

Não foram outros os rezultados colhidos na variola. Ao contrario de CASAGRANDI, BEINTKER e SUGAI que assinalaram no soro de variolozos anticorpos para virus da vacina e para o da variola não chegámos na maioria dos cazos a essa concluzão. Em cazos de variola e varicela registra NICOLAU BETTENCOURT a impossibilidade de pesquizar pela reação de BORDET, anticorpos especificos.

Procurámos variar o mais possivel as condições de experiencia, empregando como antijeno o liquido claro retirado da vesicula de um doente de variola confluente no 3.º dia de molestia, soro de um doente de variola hemorajica no segundo dia de enfermidade, conteudo de pustulas variolozas em dias diferentes de evolução clinica, ora filtrado em papel grosso, ora em vela BERKEFELD, extrato de figado de variolozo da forma confluente e hemorajica e do baço de um variolozo da forma gangrenoza.

Para esses antijenos procurámos anticorpos no soro de coelhos inoculados com vacina, puz de variolozo, extrato de baço e em soro de variolozos no 11.º, 12.º, 14.º, 15.º, 17.º, 20.º, 25.º e 40.º dia de molestia.

Empregámos, como já o fizemos, na infeção vacinica complementos de soros diversos (cobaia, coelho, cabra e vitelo) porque atenta a pluralidade de complementos poder-se ia explicar pela falta de um complemento que se adaptase ao anticorpo o rezultado negativo da experiencia.

Do quadro n.º 7 é facil verificar que só em um cazo para·o qual nenhuma explicação aventamos o soro de um doente no 18.º dia

vom 5. Tage und drei andere intravenöse von 1,3 und 4 ccm. Glycerinlymphe. Acht Tage nach der letzten Impfung machte ich bei dem Tiere einen Aderlass an der Jugularis.

Zur Herstellung des Antigens diente folgende Technik: In einer Reibschale wurde während 20 bis 30 Minuten frische Glycerinlymphe zerrieben; nach 10 bis 12-stündigem Schütteln wurde dieselbe auf eine Centrifuge von grosser Umlaufsgeschwindigkeit gebracht und auf diese Weise eine klare Flüssigkeit ohne suspendirte Partikel gewonnen, welche das Vaccinevirus enthalten musste. Bei allen Versuchen waren die Resultate negativ, sei es nun, dass das Komplement von Meerschweinchen, Kaninchen, Ziegen oder Kälbern herrührte.

Auch bei der Variola erhielt ich dasselbe Resultat. Im Gegensatz zu CASAGRANDI, BEINTKER und SUGAI, welche im Serum von Pockenkranken Antikörper für Vaccine- und Variolavirus fanden, kam ich in der Mehrzahl der Fälle zu einem negativen Resultate. Bei Variola- und Varizella-Fällen konstatirte NICOLAU BETTENCOURT die Unmöglichkeit, spezifische Körper durch die BORDET'sche Reaktion nachzuweisen.

Ich versuchte die Bedingungen der Experimente möglichst mannigfaltig zu gestalten, indem ich als Antigen die, aus einem Bläschen eines Kranken mit confluirender Variola am 3. Krankheitstage entnommene, klare Flüssigkeit, das Blutserum eines Falles von Variola hämorrhagica am 2. Krankheitstage oder den Inhalt von Pockenpusteln (an verschiedenen Krankheitstagen entnommen und durch dickes Filtrirpapier oder BERKEFELD-Filter filtrirt) anwandte, ferner Leberextrakt von Fällen der confluirenden und hämorrhagischen Form und Milzextrakt von gangraenösen Pocken.

Für diese Antigene suchte ich Antikörper im Serum von Kaninchen, die mit Vaccine, Variola-Eiter, Milzextrakt geimpft waren, und im Serum von Pockenkranken am 11., 12., 14., 15., 17., 20., 25. und 40. Krankheitstage.

Wie schon bei der Vaccineinfektion verwandte ich Komplemente verschiedener Sera (von Meerschweinchen, Kaninchen, Kälbern und von Ziegen), weil man, in Hinsicht auf

de molestia impedia hemolise quando em prezença de puz variolozo.

V. PROWAZEK e ARAGÃO, que na mesma conjuntura estudaram a ação paralizante que sobre o virus vacinico excercia o soro do variolozo não a assinalaram nesse caso, registrando-a, entretanto, no soro de um doente no 21.º dia de molestia.

De estudos serolojicos anteriormente realizados: pesquiza de lisinas e antitoxinas (HUGUENIN e v. PIRQUET) assim como da serie de fatos acima relatados licito é concluir que não é o soro e sim a celula o depositario da imunidade duradoura conferida pela vacina.

Quadro 7

2 horas a 37°

1 hora a 37°						
Pus variolozo filtrado em papel	Soro de variolozo, 18.º dia, inativado	Soro normal humano, inativado	Complemento: Soro de cobaia 1:10	Soro de coelho × carneiro 1:100	Globulos de carneiro 5 %	Rezultado
0,1	0,1	—	1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,05	—	»	»	»	—
»	0,01	—	»	»	»	+ +
	0,005	—	»	»	»	+ + +
	—	0,1	»	»	»	+ +
	—	0,05	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,2	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2	—	»	»	»	+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	—	»	—

Na vacinação cutanea ao contrario do que se dá na cornea do coelho a imunidade se estende a todas as celulas do envolucro epitelial. O desprendimento dos imunicorpos, a subsequente pasajem no sangue e fixação nas celulas visceraes encontra evidente contestação nos trabalhos de BERMBACH acima citados.

Na infeção rabica, no trachoma, no epitelioma dos pombos e na peste das galinhas manifestava se sempre hemolize total.

die Pluralität der Komplemente, das negative Versuchsresultat aus dem Fehlen eines Komplementes erklären konnte, welches sich mit dem Zwischenkörper verbinden könnte.

Aus Tabelle N.º 7 ersieht man ohne Schwierigkeit, dass nur in einem Falle, für den ich keine Erklärung bieten kann, das Blutserum eines am 18. Krankheitstage stehenden Patienten in Gegenwart von Variola-Eiter die Hämolyse verhinderte.

V. PROWAZEK und ARAGÃO, die zur selben Zeit den hemmenden Einfluss des Serums Pockenkranker auf Vaccinevirus studirten, vermissten ihn bei diesem Falle, fanden ihn dagegen in einem Serum vom 21. Krankheitstage. Aus früher gemachten serologischen Studien: Untersuchungen auf Lysine und Antitoxine (HÜGUENIN und v. PIRQUET) ebenso, wie aus der oben berichteten Reihe von Beobachtungen, kann man schliessen, dass es nicht das Serum, sondern die Zelle ist, in welcher die, durch die Vaccine erworbene, dauernde Immunität, enthalten ist.

Tafel 7

2 Stunden auf 37°

1 Stunde auf 37°						
Durch Papier filtrirter variolöser Eiter	18 Tage inaktivirtes variolöses Serum	Inaktivirtes menschliches Normalserum	Komplement: Meerschweinchenserum 1:10	Kaninchen-Hammelblutserum 1:100	5 % Hammelblutkörperchen	Resultat
0,1	0,1	—	1 cc	1 cc	1 cc	—
»	0,05	—	»	»	»	—
»	0,01	—	»	»	»	+ +
	0,005	—	»	»	»	+ + +
	—	0,1	»	»	»	+ +
»	—	0,05	»	»	»	+ + +
»	—	0,01	»	»	»	+ + +
»	—	0,005	»	»	»	+ + +
0,2	—	—	»	»	»	+ + +
—	0,2					+ + +
—	—	0,2	»	»	»	+ + +
—	—	—	»	»	»	+ + +
—	—	—	—	—	»	—
—	—	—	—	—	»	—

Im Gegensatz zu den Beobachtungen an der Kaninchencornea, estreckt sich bei der kutanen Impfung die Immunität auf alle Zellen

Na raiva concordam os experimentadores na impossibilidade de, pela fixação de complemento, surpreender a formação de anticorpos. São negativos os trabalhos de HELLER e TOMARKIN, FRIEDBERGER, v. BARONI, M. CINCA e C. TONESCA, MIHAESTI, SATTA e DONATI.

Empregando como antijeno emulsão de cortex cerebral de coelho (virus das ruas) triturado em gral e centrifugado apoz forte agitação procuramos verificar a formação de produtos de reação especifica em coelho quatro vezes inoculado com uma emulsão aquecida a 40° durante 15′ de cortex e bulbo de boi rabido e em um coelho experimentalmente infetado que morreu em sete dias. Entre as inoculações mediaram cinco dias e entre a sangria e a ultima inoculação uma semana.

Na peste das galinhas acreditamos serem nossos os primeiros ensaios de fixação de complemento.

A centrifugação demorada de emulsão cerebral de galinha infetada fornecia-nos antijeno para os estudos. Devido á exajerada sensibilidade das galinhas ao virus ativo aquecemol-o a 55° durante 15′, diminuindo assim a virulencia e permitindo mais de uma inoculação.

Em virtude da rezistencia de pombos a repetidas inoculações de elevadas dozes de virus prestava-se este animal ás experiencias que tinhamos em vista fazer.

Como acima foi repetido, foram ainda na peste de galinhas negativos os rezultados.

Em pombos espontanea e experimentalmente infetados com epitelioma contagiosum inoculámos uma suspensão em solução fiziolojica de crostas pulverizadas de epitelioma e servindo como antijeno essa emulsão pesquizámos com rezultado negativo anticorpo no soro dos pombos.

No tracoma limitaram-se a tres doentes nossas verificações.

Constava o antijeno de secreção seca e pulverizada em suspensão em solução fiziolojica.

der Epithelialdecke. Die Entbindung der Immunkörper und der nachfolgende Uebergang ins Blut, sowie die Fixirung in den Visceralzellen wird durch die oben citirten Arbeiten von BERMBACH widerlegt.

Bei der Hydrophobie, dem Trachom, dem Epiteliom der Tauben und der Hühnerpest ergab sich immer eine totale Hämolyse. Bei der Wut stimmen die Untersucher darin überein, dass es unmöglich ist, durch Komplementablenkung die Bildung von Antikörpern zu entdecken. Die Arbeiten von HELLER und TOMARKIN, FRIEDBERGER, v. BARONI, M. CINCA und C. TONESCA, MIHAESTI und SATTA und DONATI ergaben ein negatives Resultat.

Indem ich als Antigen eine Emulsion der Hirnrinde des Kaninchen (Strassenvirus), zerrieben und nach starkem Schütteln centrifugirt, verwendete, suchte ich die Bildung von Reaktionsprodukten bei Kaninchen zu konstatiren, welche viermal mit einer 15 Minuten lang auf 40° erwärmten Rindenemulsion und dem Bulbus eines tollen Rindes geimpft waren, ausserdem bei einem experimentell infizirten Kaninchen, das am 7. Tage starb. Von einer Impfung zur anderen wartete ich 5 Tage und von der letzten bis zur Blutentnahme eine Woche.

Bei der Hühnerpest glaube ich, dass meine Versuche über Komplementablenkung die ersten sind. Die langdauernde Centrifugirung der Hirnemulsion eines infizirten Huhnes lieferte das Antigen zu meinen Versuchen. Wegen der ausserordentlichen Empfindlichkeit der Hühner für das aktive Virus erhitzte ich dasselbe während 15 Minuten auf 55°, wodurch die Virulenz herabgesetzt und eine wiederholte Impfung ermöglicht wurde.

In Folge ihrer Resistenz gegen wiederholte Einimpfung grosser Virusmengen eigneten sich die Tauben für die Versuche, die ich beabsichtigte. Wie schon oben erwähnt, waren auch bei der Hühnerpest die Resultate negativ.

Bei, spontan und experimentell, mit Epithelioma contagiosum infizirten Tauben, injizirte ich eine Suspension von pulverisirten Epitheliomkrusten in physiologischer Lösung und gebrauchte als Antigen dieselbe Emulsion; die Untersuchung auf Antikörper im Serum der Tauben ergab ein negatives Resultat.

Como em trabalhos anteriores verificára RÖMER não se observa no tracoma impedimento algum de hemolize.

Recentes estudos de MARONGUI no Instituto de Hijiene de Cagliari contem a afirmação de que no soro tracomatozo existe uma sensibilizadora especifica de modo que a hemolize que se manifesta em presença do bacilo de KOCH-WEECKS e do de MÜLLER não se manifesta em prezença do virus do tracoma. A esse ponto pretendemos ainda voltar quando dispuzermos de maior material.

Bei Trachom beschränkten sich meine Untersuchungen auf drei Patienten. Das Antigen bestand in getrocknetem und pulverisirtem Sekrete, welches in physiologischer Lösung suspendirt wurde. Wie schon RÖMER in früheren Arbeiten feststellte, beobachtet man bei Trachom keine Behinderung der Hämolyse.

Neuere Studien von MARONGUI im Instituto di Igiene di Cagliari enthalten die Angaben, dass im trachomatösen Serum ein spezifischer Antikörper existirt, sodass bei Gegenwart des Trachomvirus die Hämolyse nicht stattfindet, welche bei Vorhandensein der Bazillen von KOCH-WEEKS und MÜLLER erfolgt. Auf diesen Punkt gedenke ich noch zurückzukommen, sobald ich über mehr Material verfüge.

Contribuição para o conhecimento das especies brazileiras do genero "Simulium"

pelo

Dr. Adolpho Lutz

Beitrag zur Kenntniss der brasilianischen Simuliumarten

von

Dr. Adolph Lutz.

Aos dipteros chupadores de sangue, além de outros grupos geralmente conhecidos, pertencem tambem as especies do genero *Simulium*, chamadas *borrachudos* nos Estados do Rio de Janeiro e S. Paulo e *Piúm* no Norte do Brazil; em muitos lugares estes dipteros impõem-se á atenção geral pelo seu grande numero e suas picadas dolorozas.

As especies de *Simulium* geralmente são de tamanho pequeno e na sua aparencia exterior são mais parecidas a pequenas moscas que a mosquitos tipicos, como os culícidas; são, todavia, mais proximos dos ultimos, por cauza das antenas multiarticulares e, como, tambem, fica provado, pelo estudo de seus estados anteriores. Estes são encontrados sómente em agua bastante ajitada; em consequencia disso os simúlidas são muito menos geralmente espalhados que a maior parte dos outros dipteros sanguesugas, porque em terrenos planos são naturalmente mais raros ou faltam completamente. Tambem o numero das especies conhecidas é menor que o dos culícidas e tabánidas, não obstante sua vasta distribuição geografica. Na Europa, SCHINER enumera 29 especies; OSTEN-SACKEN, nos Estados Unidos, 5 especies. Este numero elevou-se, depois, a 15 especies bem diferenciadas. O mesmo autor cita 4 especias do Mexico e uma de Cuba; PHILIPPI descreve 7

Zu den blutsaugenden Zweiflüglern gehören neben anderen, allgemein bekannten Gruppen auch die Arten des Genus *Simulium*, die in den Staaten Rio de Janeiro und São Paulo als «*borrachudos*» und im Norden als «*piúm*» bezeichnet werden und sich vielerorts der Aufmerksamkeit des Publikums durch ihr zahlreiches Auftreten und ihre schmerzhaften Stiche geradezu aufdrängen. (Der deutsche Name wird gewöhnlich als «*Kriebelmücken*» angegeben, erfreut sich aber, wie das Insect selbst, einer weit geringeren Bekanntheit).

Die *Simuliumarten* haben durchwegs nur eine geringe Grösse und gleichen in ihrer äusseren Erscheinung mehr kleinen Fliegen, als Stechmücken, trotzdem sie wegen ihrer vielgliedrigen Fühler den letzteren näher stehen, wie auch aus der Betrachtung ihrer ersten Stadien ohne weiteres hervorgeht. Diese werden nur in stark bewegtem Wasser gefunden und in Folge dessen ist die Verbreitung der Simulien eine viel weniger allgemeine, als diejenige der meisten anderen blutsaugenden Zweiflügler, indem sie in flachen Gegenden natürlicherweise seltener sind und häufig ganz fehlen. Auch die Zahl der bekannten Species ist eine weit geringere, als bei den Culiciden und Tabaniden, obgleich ihre geographische Verbreitung eine weite ist. In Europa zählt SCHINER 29 Arten auf; in den Vereinigten Staaten

especies chilenas, BLANCHARD 1 e BIGOT 2 da Patagonia, emquanto do Brazil só ha 4 conhecidas. Em geral, os simúlidas são pouco estudados e, além das especies descritas, frequentemente pouco distintas, ha, sem duvida, muitas outras que escaparam á atenção, em parte, por não incomodar tanto o homem.

As especies conhecidas de *Simulium* têm, em geral, tipo bastante uniforme e, por isso, são facilmente reconhecidas. Além do tamanho e da côr geral, são principalmente a côr e o dezenho do escudo e das pernas que permitem diferenciação, nem sempre facil; as larvas pouco se distinguem, emquanto que nas ninfas a ramificação dos sifões respiratorios oferece, muitas vezes, carater anatomico de grande valor. O modo de viver, geralmente parece muito semelhante, como rezulta da comparação das observações feitas na America do Norte com as minhas, das quais em seguida dou breve descrição.

Para a postura dos ovos as femeas preferem pequenos corregos com bastante queda e procuram os logares onde estes formam cachoeiras, nas quais se acham plantas herbaceas, folhas secas, raizes ou galhos finos; nestes os ovos são depozitados imediatamente acima do nivel da agua, de modo que, na primeira enchente fiquem banhados, permitindo que as larvas saidas entrem na agua. Na America do Norte a postura dos ovos foi observada nas proprias pedras, onde, tambem, se encontravam as larvas; mas, entre nós, as cachoeiras, onde ha sómente pedras, nunca contêm maior numero de larvas.

As larvas, em geral, são cilindricas e um pouco achatadas em sentido dorso-ventral; a parte posterior é mais ou menos entumecida, em fórma de clava, e munida de orgam de adezão terminal; outro orgam semelhante encontra-se num processo em fórma de pé truncado situado na metade cefalica da face ventral; por meio destes orgãos a larva póde caminhar ao modo das lagartas *geometridas*. Além disso póde formar fio de seda e por estes meios sabe alcançar qualquer lugar, não obstante a mais forte correnteza. Chegada ao

waren nach OSTEN-SACKEN 5 gute Species bekannt, doch hat sich die Zahl der sicher verschiedenen Arten neuerdings auf 15 vermehrt. Weitere 4 Arten führt der letztere Autor aus Mexico und eine fünfte aus Cuba an; PHILIPPI beschreibt 7 Arten aus Chile, BLANCHARD 1 und BIGOT deren 2 aus Patagonien, während aus Brasilien erst 4 bekannt geworden sind. Im Ganzen sind die Simuliden wenig studirt und, ausser den — oft nicht leicht auseinanderzuhaltenden — beschriebenen Speciés, giebt es zweifellos noch viele andere, die zum Teil deswegen der Aufmerksamkeit entgangen sind, weil sie dem Menschen weniger lästig fallen.

Die bekannten Simuliumarten tragen im Ganzen ein ziemlich einheitliches Gepräge und sind daher leicht zu erkennen. Ausser der Grösse und Gesamtfärbung ist es besonders die Färbung und Zeichnung des Brustschildes und der Beine, welche eine — nicht immer leichte — Unterscheidung gestattet; die Larven sehen sich ziemlich gleich, während bei den Nymphen die Verzweigung der Athmungsröhren in vielen Fällen einen sehr wertvollen anatomischen Character darbietet. Die Lebensweise scheint durchwegs eine sehr ähnliche zu sein, wie aus der Vergleichung meiner hiesigen Beobachtungen mit den in Nordamerika gemachten hervorgeht, und soll in Folgendem kurz characterisirt werden.

Zur Eierablage bevorzugen die Weibchen Bäche mit starkem Gefälle und suchen die Stellen auf, wo dieselben kleine Wasserfälle bilden, in und um welche sich grüne Blätter, Gras, Wurzeln und Zweige finden, auf welchen die Eierablage dicht über dem Wasserspiegel stattfindet, sodass sie beim nächsten Ansteigen desselben benetzt werden und die ausschlüpfenden Larven ins Wasser gelangen können.

Die Larven sind im Ganzen cylindrisch und etwas dorsoventral abgeflacht, doch ist das Hinterende mehr oder weniger keulenförmig und überdies am Ende mit einem Haftorgan ausgestattet; ein zweites ähnliches findet sich auf einem stummelfussartigen Fortsatze der Ventralfläche, wodurch es der Larve ermöglicht wird, sich nach Art der Spannerraupen fortzubewegen. Ausserdem ist dieselbe im Stande, einen Faden zu spinnen und kann

lugar de escolha ella se fixa com a ventoza terminal, ficando frequentemente todo corpo em vibração continua. Na extremidade cefalica ha dous pentes de cerdas em forma de leque que pódem ser dobrados e em parte retraidos; sua função parece consistir em levar os alimentos á boca. Nas aguas geralmente claras estes alimentos não são muito abundantes e, por isso, provavelmente, quazi tudo o que se oferece é aproveitado, quer dizer, além de detritos animais e vejetais, principalmente pequenos organismos, tanto plantas como animais, por exemplo, diatomaceas, algas, principalmente unicelulares, e protozoarios. As duas primeiras encontrámos no conteúdo intestinal.

Observam-se duas antenas e duas manchas de pigmento em forma de olhos rudimentares situadas sobre a capsula cefalica quitinoza e um orgam em forma de apendice branquial, na extremidade posterior. A pele é liza e bastante transparente, de modo que antes da formação do cazulo, já se pódem reconhecer os futuros apendices traqueais da ninfa, formando mancha preta distinta debaixo da pele da larva. A côr geral desta é esverdeada ou pardo-olivacea o que, em parte, depende da alimentação. As larvas são geralmente encontradas, em maior numero, e pódem ser facilmente creadas, com a condição de se observar certas precauções; assim obtem-se tambem os machos que conhecemos de trez das nossas especies, e que, além dos carateres sexuais distinguem-se pelas dimensões menores e pelos olhos confluentes, tendo pelo lado de cima facetas maiores. Como os machos não chupam sangue e por isso não procuram o homem, não são facilmente obtidos; apenas pódem ser encontrados, ás vezes, nas vidraças das janelas, principalmente, quando são acarretados por vento constante dos seus creadouros, muitas vezes bastante distantes.

Para transformar-se, as larvas tecem um cazulo conico um pouco achatado e aberto em cima, em forma de cartucho de papel, no qual a ninfa (que tem forma correspondente) se acha como implantada, saindo apenas os

mittelst dieser Hilfsmittel auch in der stärksten Strömung jeden Platz erreichen; am Orte der Wahl fixirt sie sich mit dem terminalen Saugnapfe, wobei häufig der Körper beständig vibrirt. Am Kopfende finden sich zwei Borstenkämme, welche fächerartig gefaltet und teilweise eingezogen werden können und mit deren Hilfe die Nahrung der Mundöffnung zugeführt wird. Erstere ist in solchen, gewöhnlich klaren, Gewässern nicht überreichlich und es wird daher wohl nahezu Alles verwendet, was sich bietet, d. h., ausser vegetabilischem und animalischem Detritus besonders kleine pflanzliche und tierische Organismen, wie Diatomeen, Algen, besonders einzellige, und Protozoen; erstere zwei fand ich im Darminhalt.

Auf der chitinösen Kopfkapsel sieht man noch ein Paar von Antennen und zwei an Augen erinnernde Pigmentflecke; am Schwanzende liegt ein einziehbares kiemenartiges Organ. Die Haut ist glatt und ziemlich durchsichtig, sodass man vor der Verpuppung die noch zusammengefalteten Tracheenanhänge der Nymphe deutlich als schwarzen Fleck erkennen kann. Die Gesamtfarbe ist grünlich oder olivenbraun, was wohl teilweise von der Nahrung abhängt. Die Larven finden sich meist in grösserer Zahl und können unter besonderen Vorsichtsmassregeln leicht gezüchtet werden, wodurch man auch die männlichen Mücken erhält, die sich bei unseren Arten besonders durch kleinere Dimensionen, sowie durch die zusammenstossenden und oben gröber facettirten Augen unterscheiden. Da sie kein Blut saugen, suchen sie den Menschen und die Tiere nicht auf und sind daher schwerer zu beschaffen. Am Leichtesten erhält man sie noch an Fensterscheiben, besonders wenn sie durch eine bestimmte Windrichtung von ihren — oft ziemlich entlegenen — Brüteplätzen hergeführt werden, wie ich das oft beobachten konnte.

Zur Verpuppung spinnen die Larven ein oben offenes, dütenförmiges Gehäuse, das etwas abgeflacht ist und in welchem die entsprechend geformte Nymphe, wie hineingesteckt, sitzt, während die Athmungsorgane in Form freier Tracheenbüschel hervorragen. Die Verwandlung findet immer unter dem Was-

filamentos traqueais livres que servem para a respiração. A metamorfoze tem lugar dentro da agua, as vezes em bastante profundidade, e o inseto adulto sae perfeito e sobe pela agua com a maior facilidade, sem sequer molhar-se. E' facil repetir este processo interessante colocando um borrachudo novo numa proveta onde ha um pouco de agua; póde-se então virar o tubo, qualquer numero de vezes, sem que o mosquito sofra passando pela agua, emquanto estiver protejido pelo seu revestimento intato de pêlos e escamas.

Na agua não ajitada as larvas morrem em poucas horas, mas pódem ser conservadas em vazos de cultura ligados ao encanamento de agua; nestas condições aparece claramente que as larvas procuram o lugar de correnteza mais forte. Por este meio póde-se reunil-as em certos pontos e obrigal-as a se fixar em tubos ou laminas de vidro. Das ninfas, em estádo adiantado, póde-se obter as imajens nas primeiras horas, sem uzo de agua ajitada o que aprezenta grande vantajem, visto a facilidade com que se póde encontrar as ninfas.

Tenho creado de larvas e ninfas centenares de insetos adultos pertencentes a duas especies, e, de terceira, pelo menos alguns individuos. Não é raro encontrar-se larvas infetadas por *nosema* ou contendo uma *agamomermis,* o que se reconhece facilmente, porque tanto os vermes, como os quistos de nozema, aparecem pelo tegumento transparente; geralmente, são encontrados na parte posterior do corpo, onde ha mais espaço.

Não me foi possivel observar a copulação dos adultos e não me consta que já tivesse sido descrita; póde-se encontrar os dous sexos em distancia consideravel dos seus criadouros sendo elles bastante influenciados pelo vento reinante. A absorção de sangue parece ter lugar sómente depois da copula e se limita ás femeas; póde se observar em todas as especies, sendo porém os habitos diferentes; emquanto que o *Simulium venustum* SAY reprezenta a especie que mais incomoda o homem, o *albimanum* de MACQUART ataca de preferencia os cavalos, em prezença dos quais, raramente molesta as pessoas.

serspiegel statt, oft in ziemlicher Tiefe; die Mücke schlüpft ganz fertig aus und steigt mit grösster Leichtigkeit durch das Wasser nach oben, ohne nur nass zu werden. Man kann diesen interessanten Vorgang wiederholen, wenn man die Mücke mit etwas Wasser zusammen in ein Reagensglas bringt; dasselbe kann man dann beliebig oft umdrehen, ohne der Mücke zu schaden, solange sie noch ihr vollständiges Haar- und Schuppenkleid besitzt.

In nicht bewegtem Wasser sterben die Larven bereits nach wenigen Stunden ab; man kann sie aber leicht züchten, wenn man die Gefässe an die Wasserleitung anschliesst, wobei man dann sehr schön beobachten kann, wie die Larven immer diejenigen Stellen aufsuchen, wo die Strömung am stärksten ist. Man kann sie auf diese Weise an eine bestimmte Stelle hinlocken und zur Fixirung in Glasröhren oder auf Glasscheiben veranlassen. Aus vorgerückten Nymphen erhält man die Imago in den ersten Stunden ohne besondere Vorsichtsmassregeln, was um so wichtiger ist, als es gewöhnlich nicht schwer hält, zahlreiche Nymphen einzusammeln.

Aus Nymphen und Larven habe ich zwei der hiesigen Arten zu Hunderten und eine dritte wenigstens in einigen Exemplaren gezogen. Häufig findet man Larven, welche mit einer *Agamomermis* oder mit einer *Nosema*-art inficirt sind, was man leicht erkennt, da sowohl die Cysten der letzteren, wie die Wurmlarven deutlich durch das Integument durchscheinen. Gewöhnlich sind sie im Hinterleibe zu finden, wo am meisten Raum vorhanden ist.

Bei den Imagines gelang die Beobachtung der Copulation nicht und es liegen auch, meines Wissens, keine Beobachtungen darüber vor; beide Geschlechter werden gelegentlich weit von ihren Brutplätzen beobachtet, wobei sie deutlich von der Windrichtung beeinflusst werden. Die Blutaufnahme findet wohl erst nach der Begattung statt und ist, wie schon oben gesagt, auf die Weibchen beschränkt. Sie wird bei allen unseren Arten beobachtet; jedoch verhalten sie sich dabei verschieden; während *Simulium venustum* SAY für den Menschen die lästigste Art darstellt, greift *S. albimanum* MACQ. mit Vorliebe Pferde an und

S. venustum SAY *(pertinax* KOLLAR) é observado em toda a extensão das serras costeiras do Rio de Janeiro e S. Paulo com a maior abundancia. Como a *Stegomyia* é ao mesmo tempo insistente e arisco, acompanhando o homem constantemente, mas só picando quando não é observado, de modo que o momento da picada muitas vezes passa despercebido; por isso ha muitas pessoas que não conhecem os borrachudos. A propria picada não é muito doloroza, não obstante ser o canal de punção mais largo que nos pernilongos e sempre marcado por ponto vermelho carateristico; rapidamente, porém, segue-se forte irritação com prurido, dôr e inchação, podendo-se então expremer um liquido serozo abundante pelo canal de punção. Ha pessoas que depois de picadas no dorso da mão aprezentam tumefação intensa de toda a rejião.

Nas estações situadas entre S. Paulo e Santos, na raiz da serra, estes borrachudos invadem os carros da estrada de ferro, onde picam de preferencia as crianças mais novas como estas acuzam logo por gritos, que os paes nem sempre pódem explicar; todavia a mesma especie em São Paulo, na elevação de 700 — 800 metros acima do mar, não mostra tendencia a atacar o homem, nem sequer na vizinhaça dos seus criadouros. Isto não póde ser explicado apenas pela diferença de elevação e temperatura, porque vi as especies *rubrithorax e montanum* atacar gente na altura de 1.500 metros acima do mar. Da mesma forma o *Simulium perflavum* ROUBAUD *(ochraceum* WALKER?*)* em São Paulo, onde abunda, nunca ataca o homem; assim mesmo recebi do interior exemplares cheios de sangue humano.

Esta diferença singular de habitos que se observa tambem em alguns culícidas parece explicar-se pelo fato que estes insetos, em certos lugares são acostumados a procurar alimentação em outras fontes; porque não se póde duvidar que precizem de alimento abundante e de proveniencia animal para amadurecer os ovos. Deve-se contar por isso tambem com os grandes animais domesticos, como mostra o *nigrimanum* acima citado, que ataca,

belästigt den Menschen in deren Gegenwart kaum.

Simulium venustum SAY wird allenthalben in den Küstenketten von Rio de Janeiro und S. Paulo in grösster Menge angetroffen und verhält sich, ähnlich, wie die *Stegomyia*, zudringlich und scheu zugleich, indem es den Menschen beständig umschwärmt, aber nur in unbewachten Augenblicken sticht, sodass der Stich oft nicht einmal bemerkt wird, weswegen viele Leute die Mücke nicht kennen. Der Stich ist im Augenblick nicht sehr schmerzhaft, trotzdem der Stichkanal viel weiter ist, als bei den Mosquitos und immer als characteristischer roter Punkt erscheint. Sehr bald treten aber starke Reizerscheinungen auf, indem die Umgebung anschwillt, schmerzt und juckt, wobei sich aus dem Stichkanal reichlich seröse Flüssigkeit ausdrücken lässt. Bei manchen Leuten genügt ein Stich auf den Handrücken, um eine polsterförmige Anschwellung desselben hervorzurufen.

Während diese Art zwischen Santos und S. Paulo regelmässig in den am Fusse der Berge gelegenen Stationen in die Eisenbahnwagen eindringt und besonders gern ganz kleine Kinder sticht, wie man an deren — den Eltern oft unerklärlichem — Weinen erkennt, zeigt dieselbe in dem zwischen 700 und 800 Meter hoch gelegenen S. Paulo gar keine Tendenz, den Menschen zu verfolgen, nicht einmal in der Nähe ihrer Brutplätze. Es erklärt sich dies nicht allein aus dem Unterschiede der Temperatur und noch weniger aus dem der Lage, denn ich habe *S. rubrithorax* und *montanum* den Menschen noch bei einer Höhe von 1.500 Metern angreifen sehen. Ebenso ignorirt *S. perflavum* ROUBAUD, welches in S. Paulo gemein ist, daselbst den Menschen vollständig, während mir aus einem ziemlich entfernten Platz mit menschlichem Blut gefüllte Exemplare gebracht wurden.

Diese eigentümliche Verschiedenheit in den Gewohnheiten, die ja auch bei Stechmücken nicht selten beobachtet wird, erklärt sich wohl einfach so, dass diese Insekten an solchen Orten ihr Nahrungsbedürfniss an einer anderen Quelle zu decken gewöhnt sind, denn es unterliegt wohl keinem Zweifel, dass zur Rei-

de preferencia, os cavalos, formando as femeas mais ou menos repletas de sangue verdadeira corôa nas marjens orbitais de suas vitimas. *S. venustum* ataca tambem cavalos, cães e provavelmente muitos outros animais, sendo que, em tempos passados, as especies indijenas devem ter procurado principalmente o sangue dos grandes animais de caça.

E' conhecido que na Hungria e nos Estados Unidos especies de *Simulium*, aparecendo em exames colossaes, pódem determinar mortandade enorme do gado, perecendo os animais picados em consequencia de intoxicação ou de asfixia, porque nem as mucozas são poupadas. A ideia que os animais, que fojem como loucos, morram apenas de cansaço ou de excitação parece menos acertada, mas, é certo que pódem se ferir seriamente nessas ocaziões. Cita-se até exemplos de pessoas que sucumbiram aos ataques destes dipteros terriveis. Ha tambem na America do Norte especie que destróe os perús, o que mostra que ás vezes tambem atacam passaros. Quanto á perseguição de animais de sangue frio faltam observações e, em relação a insetos, só conheço uma.

Entre nós os borrachudos não cauzam prejuizos tão serios, nem ameaçam a vida do homem, mas, suas perseguições são suficientes para desgostal-os de certos logares e a irritação produzida pelas picadas contribue para determinar feridas supuradas, tão frequentemente observadas.

Embora, até ha pouco, todos os borrachudos estivessem reunidos no unico genero *Simulium*, parece justificado consideral-os como formando familia a parte entre os dipteros, porque não pódem entrar sem dificuldade em uma das outras. Isto tambem é hoje geralmente aceito. Para a definição desta familia servem, assim, ao mesmo tempo os caracteres do genero, dos quais SCHINER (Fauna austriaca. Die Fliegen. Wien 1864) deu boa synteze, á qual empresto o seguinte:

«Cabeça livre, face inferior breve; tromba um pouco saliente; palpos com quatro articulos sendo o bazal muito curto e o terminal bastante alongado; antenas curtas, bastante

fung der Eier eine reichliche animalische Nahrung erforderlich ist. In dieser Hinsicht ist besonders an die grösseren Haustiere zu denken, wie das bereits erwähnte Beispiel von *S. nigrimanum* zeigt, welches vorzugsweise Pferde angreift, indem es sich besonders an den Augenhöhlenrändern niederlässt, sodass die im Saugen begriffenen Weibchen oft einen vollständigen Kranz um dieselben bilden. *S. venustum* belästigt ausser Pferden auch Hunde und wahrscheinlich noch eine Reihe von anderen Tieren, wie denn natürlich die einheimischen Arten ursprünglich für ihren Blutbedarf hauptsächlich auf das grössere Wild angewiesen waren.

Es ist bekannt, dass in Ungarn und Nordamerika in Schwärmen auftretende Simuliumarten unter dem Viehbestande die grössten Verheerungen anrichten können, indem die Tiere in Folge der vielen Stiche an Intoxication oder Asphyxie zu Grunde gehen, da auch die Schleimhäute nicht verschont werden. (Weniger wahrscheinlich klingt die Angabe, dass die blosse Erregung und Ermüdung die wie toll davonlaufenden Tiere tödten kann; wohl aber können sie bei solchen Gelegenheiten zu Schaden kommen.) Man führt auch Beispiele davon an, dass Menschen dem Stich dieser Mücken erlegen sind. Es giebt übrigens auch eine Art, welche in Nordamerika unter den Truthühnern Verheerungen anrichtet, ein Zeichen, dass sie auch Vögel nicht verschonen.

Hierzulande verursachen die Simulien weder solchen Schaden, noch bedrohen sie das Leben der Menschen, aber ihre Belästigungen reichen hin, um demselben manche Gegenden zu verleiden und der durch ihren Stich bewirkte Reiz trägt dazu bei, die so häufig beobachteten eitrigen Geschwüre hervorzurufen.

Obgleich die *Simuliumarten* bis vor kurzem zu einem einzigen Genus gerechnet wurden, scheint es doch berechtigt, für dasselbe eine eigene Dipterenfamilie zu bilden, da die Unterbringung in einer anderen nicht ohne Zwang stattfinden könnte. Es geschieht dies daher auch neuerdings ziemlich allgemein. Für die Definition derselben müssen wir uns daher an die Genuscharactere halten, von de-

grossas, com dez articulações; fronte do macho tão estreita que os olhos se tocam por diante, sendo a da femea bastante larga; olhos grandes reniformes, aproximando-se da forma redonda, glabros; não ha ocelos.

Escudo abaulado, sem sutura transversal; escutelo curto, em fórma de meia lua.

Abdome com sete aneis, sendo o primeiro munido de cilios marjinais; segmento abdominal obtuzo; orgãos genitais geralmente escondidos.

Pernas comparativamente curtas e fortes; coxas grossas e achatadas, metatarsos alongados, os outros articulos tarsais muito curtos, principalmente o ultimo; unhas glabras, pulvilos rudimentares.

Esquamulas rudimentares, halteres expostos, geralmente inclinados sobre o abdome.

Azas compridas e largas, com as nervuras da marjem anterior mais espessas que as outras, as quais, ás vezes, são apenas perceptiveis. Alulas grandes com angulo saliente.»

Juntamos aqui mais uns caracteres que podiam, em parte, ser aproveitados na sistematica, se não faltassem ás vezes ou se não fossem de verificação muito dificil em exemplares montados em alfinetes. As unhas da femea muitas vezes tem do lado interno pequeno dente secundario, mas é frequentemente bastante dificil de se observar; as unhas do macho, alem de dente semelhante tem um outro por fóra. As azas são cobertas de pelos microscopicos. As nervuras costais são munidas de espinhos e de cilios em distribuição variavel. Nas pernas póde haver espinhos e pelos maiores sendo alguns dos ultimos, ás vezes situados no dorso dos tarsos. As tibias são munidas de esporões geralmente dezenvolvidos no par medio, mas reduzidos no ultimo; na tibia da frente, ás vezes, encontra-se um só esporão e outras vezes parece faltar; ha tambem esporões na extremidade de alguns articulos tarsais. Ha outros pelos menores misturados com formações que parecem pelos achatados, mas devem antes ser consideradas como escamas muito compridas e estreitas; aprezentam geralmente côr vistoza, branca ou dourada e são encontradas

nen SCHINER (Fauna austriaca. Die Fliegen. Wien. 1891) eine gute Zusammenstellung giebt, welcher wir Folgendes entnehmen:

«Kopf frei, Untergesicht kurz, Rüssel etwas vorstehend; Taster viergliedrig, das Basalglied sehr kurz, das Endglied stark verlängert; Fühler kurz, ziemlich dick, zehngliedrig; Stirn des Männchens so schmal, dass sich die Augen vorn berühren, die des Weibchens ziemlich breit; Augen gross, rundlich nierenförmig, nackt, Punktaugen fehlend.

Rückenschild hochgewölbt, eine Quernaht nicht vorhanden; Schildchen halbrund, kurz.

Hinterleib sieben- bis achtringig, der erste am Rande bewimpert, Analglied stumpf, Genitalien meistens ganz versteckt.

Beine verhältnissmässig kurz und stark, Schenkel dick, breitgedrückt, Metatarsen verlängert, Tarsenglieder sehr klein, besonders das letzte; Klauen nackt; Haftläppchen rudimentär.

Schüppchen rudimentär, Schwinger unbedeckt, gewöhnlich dem Körper aufliegend. Flügel gross und breit, die am Rande gelegenen Adern dicker als die übrigen, oft kaum wahrnehmbaren. Flügellappen gross, eckig vorspringend.»

Ich füge noch einige Charactere bei, welche sich teilweise in der Systematik verwenden liessen, wenn sie nicht manchmal fehlten oder bei gespiessten Exemplaren schwer zu constatiren wären. Die Krallen der Weibchen haben häufig an der inneren Seite einen kleinen Secundärzahn, der aber öfters schwer zu erkennen ist; die Krallen des Männchens haben ausser diesem Zahne noch einen zweiten an der Aussenseite. Die Oberfläche der Flügel ist mit mikroscopischen Härchen bedeckt und die Costaladern haben Dornen und Härchen in etwas wechselnder Anordnung. An den Beinen giebt es Dornen und einzelne grössere Haare, von denen manchmal einige auf der Dorsalfläche der Tarsen stehen. Ausserdem giebt es feinere Haare und — mit diesen vermischt oder auch allein — Bildungen, die wie platte Haare aussehen, aber eigentlich als lange und schmale Schuppen aufgefasst werden müssen. Sie zeigen gewöhnlich eine auffällige weisse oder goldene Farbe und finden sich an

em cima da cabeça, do torax e nas pernas onde ocupam principalmente a face anterior. Parecem repelir a agua protejendo assim a imajen nova; mas, como são muito caducas, pódem mais tarde deixal-a dezemparada. Caraterizam muito bem as especies quando são prezentes; sua côr, as vezes, acompanha a do fundo, outras vezes, porém, dá-se o contrario. A cõr dos olhos, em exemplares frescos, é verde dourada ou aprezenta outros matizes vistozos; mas, como dezaparece nos exemplares secos, deixei de aproveital-a na parte sistematica.

De trez especies que, ha seis anos, mandei para Washington, COQUILLET considerou uma como identica ao *S. venustum* SAY; esta deve corresponder ao *S. pertinax*, citado, mas apenas superficialmente descrito, por KOLLAR. As duas outras foram consideradas identicas ao *S. nigrum* PHILIPPI, do Chile e ao *S. ochraceum* WALKER, do Mexico; ha mais duas especies descritas no Brazil, o *S. nigrimanum* MACQ. que tornei a encontrar e o *Similium amazonicum* de GOELDI que parece faltar ás nossas rejiões. Tenho mais cinco especies novas. Abaixo darei as descrições de todas estas especies, procedidas de uma chave.

Chave para derterminação
das especies brazileiras do genero *Simulium* LATR., sub-genero *Eusimulium* ROUBAUD.

1. Escudo apenas com escamas, sem outro adorno no meio. 4
2. Escudo com dezenhos 3
3. No escudo manchas alaranjadas sobre fundo escuro. Especie pequena *S. varians* n. sp. (9).
   No escudo dezenho preto sobre fundo cinzento azulado, tamanho medio *S. amazonicum* GOELDI (10).
   No escudo trez linhas ou estrias paralelas sobre fundo pardo lilaceo, especie grande. . . *S. scutistriatum* n. sp. (2).
4. Escudo vermelho; pernas bicolores, especie grande. *S. rubrithorax* n. sp. (1).
   Escudo alaranjado, tarjado de branco; especie media *S. perflavum* ROUBAUD (7).
   Escudo enegrecido 5

Kopf und Thorax auf der Oberseite; an den Beinen nehmen sie besonders die Vorderseite ein. Sie scheinen das Wasser abzustossen und so die junge Imago zu beschützen; da sie aber sehr hinfällig sind, kann die schützende Bedeckung leicht verloren gehen.

Wenn sie vorhanden sind, so kennzeichnen sie die Art sehr gut; ihre Farbe wird manchmal von derjenigen des Grundes begleitet, oft ist aber das Gegenteil der Fall. Die Farbe der Augen ist bei frischen Exemplaren goldgrün oder von anderen auffälligen Nuancen; da sie aber bei trockenen Exemplaren verschwindet, habe ich von ihrer Verwertung im systematischen Teile Abstand genommen.

Von drei Arten, welche ich vor sechs Jahren nach Washington sandte, identifizirte COQUILLET eine mit *S. venustum* SAY., diese muss dem von KOLLAR benannten, aber kaum beschriebenen *S. pertinax* entsprechen. Die beiden anderen wurden als *S. ochraceum* WALKER aus Mexico und *S. nigrum* PHILIPPI aus Chile bestimmt. Es sind noch zwei brasilianische Arten beschrieben, *S. nigrimanum* MACQ., welches ich wieder aufgefunden habe und *S. amazonicum* GOELDI, welches in unserer Gegend zu fehlen scheint. Ich besitze ausserdem noch fünf Arten, welche ich als neu ansehe und von denen vier aus S. Paulo stammen. Von diesen Arten gebe ich einen Schlüssel und weiter unten die genauere Beschreibung.

Schlüssel zur Bestimmung
der brasilianischen Arten vom Genus *Simulium* LATR., Subgenus *Eusimulium* ROUBAUD.

1. Scutum nur mit Schüppchen, ohne Zeichnung in der Mitte 4
2. Scutum mit Zeichnungen 3
3. Scutum mit orangefarbenen Flecken auf dunklem Grunde. Kleine Art. *S. varians* n. sp. (9).
   Scutum mit schwarzer Zeichnung auf graublauem Grunde. Mittelgrosse Art. *S. amazonicum* GOELDI (10)
   Scutum drei parallelen Linien oder Striemen auf braun-lilafarbenem Grunde. Grosse Art . *S. scutistriatum* n. sp. (2).
4. Scutum roth; Beine zweifarbig. Grosse Art . . . . . *S. rubrithorax* n. sp. (1).

5. Cabeça corpo e halteres escuros; pernas unicolores 7
6. Pernas bicolores 8
7. Costa e subcostal com pelos, projetados na celula costal; especie pequena
S. hirticosta n. sp. (4).
Costa com pelos mais curtos; especie grande . . . . *S. montanum* PHIL. (3).
8. Halteres pardo-ocraceos; femures posteriores enegrecidos.
S. venustum SAY, *var. infuscata* n. *var.* (5a).
9. Halteres de côr amarela muito clara. . 10
10. Antenas completamente negras; especie pequena . . . *S. exiguum* n. sp. (8).
Antenas ocraceas, pelo menos na baze, especies maiores 11
11. Tibia anterior com fundo enegrecido.
S. albimanum MACQ. (6).
12. Tibias anteriores com fundo ocraceo basrante claro.
S. venustum SAY. (5).

1. *Simulium rubrithorax* n. sp. Côr geral preta e vermelha, comprimento 3 a 4 mm.

Cabeça, preta com brilho prateado, tromba e palpos pardo-ferrujinozos; occiput com pelos bastante compridos.

Torax: escudo vermelho escuro, alaranjado ou pardacento, com escamas piliformes douradas escutelo como o escudo, com pelos escuros na marjem livre; pleuras côr de chocolate, ás vezes um pouco avermelhada, com brilho cinzento.

Abdome, em cima enfuscado, com brilho cinzento; dos lados e em baixo com cintas claras e escuras.

Pernas: primeiro par ocraceo até os joelhos, com pelos e escamas finas, ora claras ora escuras, tibias, na parte anterior, com pó claro e escamas piliformes brancas, o resto ocraceo ou pardacento, o pé quazi preto. Segundo par como o primeiro, mas o metatarso, nos terços posteriores, de côr clara, como tambem a tibia com exceção das extremidades. Terceiro par: coxas escuras, trocanteres e femures ocraceos, como tambem a baze das

Scutum orange, mlt weissem Saum. Mittelgrosse Art *S. perflavum* ROUBAUD (7).
Scutum schwärzlich 5
5. Kopf, Leib und Halteren dunkel, Beine einfarbig 7
6. Beine zweifarbig 8
7. Costa und Subcostalader mit Haaren, die sich in die Costalzelle hineinneigen. — Kleine Art. . *S. hirticosta* n. sp. (4).
Costa mit kürzeren Haaren. Grosse Art.
S. montanum PHIL. (3).
8. Halteren bräunlich ockergelb; hinterste Schenkel schwärzlich.
S. venustum SAY var., *infuscata* n. var. (5a).
9. Halteren sehr hell gelb. 10
10. Antennen ganz schwarz. Kleine Art.
S. exiguum n. sp. (8).
Antennen wenigstens an der Basis ockergelb. Grössere Arten 11
11. Vorderste Tibia mit dunklem Grunde.
S. albimanum MACQ. (6).
Vorderste Tibia mit ziemlich hell ockergelbem Grunde.
S. venustum SAY (5).

1. *Simulium rubrithorax* n. sp. Gesamtfarbe schwarz und rot, Länge 3—4 mm.

Kopf weiss mit Silberglanz, Rüssel und Palpen braun; Antennen bräunlich-rostfarben; Hinterkopf mit ziemlich langen Haaren.

Thorax: Rückenschild dunkel orange oder bräunlich rot, mit goldenen haarartigen Schuppen; Schildchen, wie der Schild, mit dunklen Haaren am freien Rande; Pleuren chocoladefarbig, manchmal etwas rötlich, mit grauem Schimmer.

Abdomen oben bräunlich, mit grauem Schimmer, seitlich und unten mit helleren und dunkleren Binden.

Beine: das erste Paar bis zu den Knieen ockergelb, mit Härchen und schmalen Schuppen, die teils hell, teils dunkel sind; Tibia an der Vorderseite hell bestäubt und mit weissen haarartigen Schüppchen besetzt, der Rest ockergelb oder braun; der Fuss fast schwarz. Zweites Paar, wie das erste, aber der Metatarsus in den oberen Dritteln von heller Farbe, die Tibia ebenso, mit Ausnahme der beiden

tibias que no restante são enegrecidas, mas cobertas de escamas estreitas claras; metatarsos na metade bazal é na maior parte da sua circumferencia claros, o resto escuro, apenas a baze do segundo articulo do pé um pouco mais claro. Unhas com um dente.

Azas como de costume, apenas na baze da costa com uns pelos mais compridos, projetados na celula costal; halteres com o capitulo de côr palida de cera, tornando-se escura em direção á baze.

Descrito de algumas femeas apanhadas na serra da Bocaina a 1500 m. de altura e em Batataes.

2. *Simulium scutistriatum* n. sp. Côr geral enegrecida, comprimento pouco mais de 4 mm.

Cabeça com fundo pardo, coberto de pó claro, mostrando escamas e pelos com brilho dourado. Tromba e palpos enegrecidos, antenas olivaceo-pardacentas, mais claras na baze e no lado inferior.

Torax: com fundo chocolate claro, em cima com matiz lilaz e escamas douradas; ha uma faixa lonjitudinal média e duas laterais mal limitadas, de côr mais escura; no meio da primeira ha uma linha muito escura e bem definida; as pleuras e o esterno com brilho claro.

Abdome: o primeiro segmento de côr preta aveludada e com pelos marjinais dourados, o resto de côr preta mate com brilho cinzento.

Pernas: primeiro par ferrujinozo claro até o joelho, a tibia enegrecida, com os trez quartos superiores da face anterior mais claros e cobertos de escamas brancas; todo o pé enegrecido; o par medio com coxa e trocanter ocraceos, um tanto enegrecidos; femur com baze ocracea enfuscada no resto, como a tibia, é chocolate, porém, nos dois terços superiores da face anterior com escamas esbranquiçadas sobre fundo claro; metatarso, na metade bazal, com fundo ocraceo e escamas brancas; todo o resto enegrecido. Terceiro par: a baze ocracea, os dois terços inferiores do femur chocolate, mas com escamas claras; a tibia com a face anterior ocracea e coberta

Enden. Drittes Paar, Coxa dunkel, Trochanteren und Schenkel ockergelb, ebenso die Basis der Schienen, die sonst schwärzlich, aber mit schmalen hellen Schuppen bedeckt sind; Metatarsen im Basalteile und am grössten Teile ihres Umfanges hell, der Rest des Fusses dunkel, nur die Basis des zweiten Tarsalgliedes etwas heller. Krallen mit einem Zahn.

Flügel wie gewöhnlich, nur am Basalteile der Costa mit etwas längeren Haaren, die sich in die Costalzelle hineinneigen; Halteren am Köpfchen von blasser Wachsfarbe, nach der Basis zu dunkel werdend.

Beschrieben nach einigen Weibchen, die in der Serra da Bocaina (bei 1500 M. Höhe) und in Batataes gefangen wurden.

2. *Simulium scutistriatum* n. sp. Gesamtfarbe schwärzlich, Länge etwas über 4 mm.

Kopf mit dunklem, hell bestäubten Grunde und goldglänzenden Härchen und Schüppchen. Rüssel nnd Palpen schwärzlich; Antennen bräunlich ockergelb, an Basis und Unterseite heller.

Thorax mit hell chocoladefarbenem Grunde, oben ins Lilafarbene spielend und mit goldfarbenen Schuppen besetzt, mit einer mittleren und zwei seitlichen dunklen Längsstriemen, die nicht deutlich abgegrenzt sind; in der Mitte der ersteren verläuft eine scharf gezeichnete sehr dunkle Längslinie; Pleuren und Sternum zeigen einen hellen Schimmer.

Abdomen: das erste Segment sammetschwarz, mit goldfarbenen Haaren gesäumt, der Rest mattschwarz mit grauem Schimmer.

Beine: das erste Paar bis zum Knie von heller Rostfarbe, die Tibia schwärzlich, aber die oberen drei Viertel der Vorderseite heller und mit weissen Schuppen besetzt, der ganze Fuss schwärzlich; zweites Paar: Coxa und Trochanter ockergelb, etwas schwärzlich, Femur mit ockergelber aber etwas gebräunter Basis; der Rest chocoladenfarbig, ebenso die Tibia, welche jedoch an den zwei oberen Dritteln der Vorderfläche weissliche Schuppen auf hellem Grunde aufweist, Metatarsus in seiner basalen Hälfte mit ockergelbem Grunde mit weissen Schuppen, der Rest des Fusses schwärzlich; drittes Paar mit ockergelber Basis, die zwei unteren Drittel des Schenkels

de pelos dourados que se estendem ainda sobre o fundo escuro do terço inferior; o pé egual ao segundo par, tendo, porém, tambem o segundo articulo tarsal a baze clara. Unhas com dente bazal bastante escondido.

Azas e halteres como na especie anterior.

Descrição fundada no exame de uma femea, apanhada pelo Sr. DAVID MADEIRA em Itaguahy (Estado do Rio de Janeiro). Lembra muito o *Similium rubrithorax,* mas distingue-se demais, para ser considerado apenas como variedade. Na coleção do Instituto ha mais duas femeas apanhadas em Xerém pelo Dr. A. NEIVA.

3. *S. montanum* PHIL. (?) Damos em seguida a tradução da descrição orijinal feita em lingua alemã por PHILIPPI no catalogo dos dipteros chilenos:

Preto, subglabro, unicolor. Comprimento do corpo duas linhas. Nas montanhas de *Chacabuco,* perto de *Catenu* etc. A auzencia total de manchas e dezenhos distingue esta especie. O occiput é coberto de pelos cinzentos e o peito de pequenos cabelos sedozos, finos e apostos, que é precizo procurar com lente de aumento.

Damos em seguida a descrição de especie encontrada aqui e considerada identica.

Côr geral preta ou chocolate escura; tamanho cerca de 3 $^1/_2$ mm.

Cabeça chocolate, a tromba um pouco mais clara, palpos quazi pretos, antenas pretas com pubecencia fina e clara e trez segmentos bazais ocraceo-pardacentos. Clipeo, fronte e vertice com escamas piliformes douradas; na marjem dos olhos em cima e atraz ha pelos grossos escuros, inclinados para diante; no vertice ha uma linha mediana deprimida.

Torax: na rejião que corresponde aos lobulos protoracicos ha pelos escuros; o escudo e o escutelo com escamas piliformes douradas sobre fundo chocolate e com algumas estrias lonjitudinais indistintas; as pleuras lijeiramente avermelhadas na metade posterior; o escutelo um pouco mais claro com fileiras marjinais de pelos escuros, compridos e grossos.

chocoladenbraun, aber mit weissen Schuppen, Tibia an der Vorderfläche ockergelb und mit goldfarbenen Haaren besetzt, die sich auch auf den dunklen Grund des unteren Drittels erstrecken; der Fuss, wie derjenige des zweiten Paares, aber das zweite Tarsalglied ebenfalls mit heller Basis. Krallen mit etwas verstecktem basalem Zahn.

Flügel wie bei der vorigen Art.

Die Beschreibung ist nach einem Weibchen, welches in Itaguahy (Staat Rio de Janeiro) von Herrn D. MADEIRA gefangen wurde; es erinnert sehr an *S. rubrithorax*, ist aber doch zu verschieden, um bloss als Varietät zu gelten. In der Sammlung des Instituts befinden sich noch zwei Weibchen, die von Dr. A. NEIVA gefangen wurden.

3. *Simulium montanum* PHIL. Ich gebe hier die Originalbeschreibung von PHILIPPI in «Aufzählung der chilenischen Dipteren» (Verh. d. k. k. bot. Ges., Bd. XV, 1865, pag. 633):

S. nigrum, subglabrum, unicolor. Long. corp. 2 lin.

In montibus de *Chacabuco* dictis, prope *Catenu* etc.

Abwesenheit aller Flecken und Zeichnungen zeichnen diese Art aus. Der Hinterkopf ist mit greisen Haaren bekleidet und die Brust mit feinen anliegenden, seidenartigen Härchen, die man mit der Lupe suchen muss.

Nachfolgend gebe ich die Beschreibung der hier gefundenen und als übereinstimmend angesehenen Species:

Allgemeinfärbung schwarz oder dunkelchocoladebraun; Länge ca. 3 $^1/_2$ mm.

Kopf chocoladenbraun, der Rüssel etwas heller, die Palpen fast schwarz, die Antennen schwarz, mit feiner heller Behaarung, und drei Basalsegmenten von bräunlich ockergelber Farbe. Clypeus, Stirn und Scheitel mit goldenen, haarähnlichen Schuppen; am Orbitalrande stehen hinten und oben dicke, dunkle Haare, die sich nach vorn neigen; auf dem Scheitel ist eine vertiefte Medianlinie.

Thorax mit dunklen Haaren in der Gegend, welche den prothoracischen Höckern entspricht, Schild und Schildchen mit goldfarbenen Haarschüppchen auf chocoladebraunem Grunde und einigen undeutlichen Längsstrie-

Abdome côr de chocolate mais ou menos enegrecido, com pelos dourados na marjem do primeiro segmento e outros mais curtos na dos outros.

Azas com a baze pardacenta, a costa chocolate com pelos e espinhos, sub-costal na baze só com pelos, no apice tambem com espinhos, as outras nervuras pardacentas; o fundo da aza com pontilhado escuro; na baze da aza ha uma faixa anterior de pelos grossos e escuros e um outro posterior de pelos finos compridos e de côr clara; halteres pardo-amarelados com o capitulo enfuscado.

Pernas enfuscadas, com pelos escuros e escamas piliformes; a incizão no segundo tarso posterior não é bem acuzada. Unhas com dente bazal curto.

Esta especie foi encontrada na serra da Bocaina, a 1.500 metros de altitude, e creada de larvas encontradas na vizinhança de Petropolis. Se for identica á especie de PHILIPPI deve ter transposto os Andes, fato excepcional, que talvez, se possa explicar pela facilidade com que se cria em logares elevados.

4. *S. hirticosta* n. sp. Tamanho geral apenas 2 mm. Côr geral chocolate.

Tromba, palpos e antenas castanhos, as ultimas um pouco mais claras, com pubecencia fina de côr esbranquiçada.

Torax côr chocolate, aveludado no escudo, um pouco mais claro no escutelo, que tem pelos marjinais compridos.

Abdome pardo-chocolate com a marjem dos segmentos um pouco mais clara, de brilho cinzento, e munida de pelos mais claros que o fundo.

Pernas de côr uniforme pardo-amarelo, com os pelos maiores pardos, os pelos finos e as escamas estreitas em parte esbranquiçadas. Unhas com pequeno dente bazal.

Azas com as nervuras de colorido pardacento claro, a costal e sub-costal cobertas de cilios bastante compridos, na primeira celula sub-costal. Halteres da côr do abdome.

Descrito de duas femeas, apanhadas na cidade de S. Paulo, onde a especie parece ser muito rara.

men; die Pleuren in der hinteren Hälfte leicht rötlich; das Schildchen etwas heller mit randständigen Reihen langer und dicker Haare von dunkler Farbe.

Abdomen chocoladebraun mehr oder weniger ins Schwarze übergehend, mit goldenen Haaren am Rande des ersten Segmentes und ebensolchen, aber kürzeren an den folgenden.

Flügel mit bräunlicher Wurzel, Costa braun mit Haaren und Dornen, Subcostalader an der Basis nur mit Haaren, am Ende auch mit Dornen; die anderen Adern bräunlich; Flügelgrund dunkel punktirt; an der Flügelwurzel nach vorn ein Büschel von dicken und dunklen Haaren, nach hinten zu ein ebensolches, aber mit langen, dünnen und goldglänzenden Haaren. Halteren bräunlich gelb mit mehr braunem Capitulum.

Beine bräunlich mit dunklen Haaren und Haarschuppen; der Einschnitt am zweiten Tarsus des Hinterfusses wenig deutlich. Die Krallen mit einem kurzen basalen Zahne.

Diese Art wurde in der Serra da Bocaina bei 1500 M. Höhe gefangen und auch aus Larven gezüchtet, die in der Nähe von Petropolis gefunden wurden. Wenn sie mit der Art von Philippi identisch ist, so muss sie die Anden überschritten haben, ein ganz ungewöhnliches Vorkommniss, das sich aber vielleicht aus der Leichtigkeit erklären liesse, mit welcher diese Art sich an hochgelegenen Orten entwickelt.

4. *Simulium hirticosta* n. sp. Gesamtfarbe braun; Gesamtlänge kaum 2 mm.

Rüssel, Palpen und Antennen kastanienbraun, die letzteren etwas heller mit feiner weisslicher Behaarung.

Thorax chocoladebraun, am Schilde sammetartig; das Schildchen etwas heller und mit langen, randständigen Haaren.

Abdomen chocoladebraun, mit etwas hellerem grauglänzenden Rande der Segmente und Haaren, die heller sind als der Grund.

Beine einfarbig gelblich braun, die grösseren Haare dunkel, die feineren Haare und Schüppchen zum Teil weisslich. Die Krallen mit kleinem Zahn an der Basis.

Flügel mit hellbräunlichem Geäder, Costa und Subcostalader mit ziemlich langen Haaren

5. *S. venustum* SAY *(S. pertinax* KOLLAR).

A especie mais comum em Rio de Janeiro e S. Paulo e que se póde considerar como orijinal da descrição de KOLLAR foi determinado por COQUILLET como *S. venustum* SAY. Com efeito a comparação com as descrições desta especie e alguns exemplares que obtive da America do Norte mostra grande semelhança até nas menores particularidades anatomicas. Quanto a côr, não ha diferença bastante pronunciada para impedir a identificação, tanto mais que a especie é considerada variavel. Não se podendo facilmente supor uma disseminação por via maritima, só resta a hipoteze que a especie se tenha estendido sobre o terreno que nos separa dos Estados Unidos, onde é encontrada em extensão muito vasta. Comquanto esta idéa, *a priori*, possa parecer estranha, não tem nada de impossivel visto a extensão e altura das cordilheiras que ligam as rejiões e onde devem abundar logares favoraveis para a procriação.

Em todo o cazo não sendo a questão completamente decidida, convem dar aqui uma descrição feita com exemplares nossos.

Tamanho geral 2 a 2,5 mm, côr geral enegrecida.

Tromba pardo-cinzenta, com pelos; antenas com pubecencia esbranquiçada, de colorido ocraceo pardacento; palpos da mesma côr, porém, mais escuros; clipeo, fronte e vertice com pó prateado; olhos de côr verde dourado; occiput côr de ardozia com brilho alvacento.

Escudo e escutelo côr de ardozia, com escamas piliformes douradas que, no escudo, são geralmente bastante espaçados e pouco compridos; no escutelo seguem em parte direção transversal.

Abdome enegrecido, o primeiro anel com pelos marjinais dourados, bastante compridos; em baixo com reflexo claro.

Azas com pelos compridos em redor da baze, com as primeiras nervuras espessadas, variando de ocraceo a pardacento; as outras nervuras de côr pardacenta apagada.

Halteres de côr amarela de cêra muito palida.

besetzt, welche in die erste Subcostalzelle hineinragen. Halteren von der Farbe des Abdomens.

Die Beschreibung bezieht sich auf zwei Weibchen, welche in der Stadt São Paulo gefangen wurden, wo die Art jedoch selten zu sein scheint.

5. *Simulium venustum* SAY (=*pertinax* KOLLAR).

Die bei Rio de Janeiro und S. Paulo weitaus häufigste Art, welche wahrscheinlich dem Originale der KOLLAR'schen Beschreibung entspricht, wurde von COQUILLET als *S. venustum* SAY bestimmt. In der Tat zeigt eine Vergleichung mit den Beschreibungen dieser Art und einigen Exemplaren, welche ich aus Nordamerika erhielt, weitgehende Aehnlichkeit auch in den kleinsten anatomischen Details. Auch in der Färbung sind die Unterschiede nicht genügend, um eine Identificirung auszuschliessen, um so mehr, als die Art als veränderlich gilt. Da eine Verbreitung auf dem Seewege nicht wohl angenommen werden kann, bleibt nur die Voraussetzung, dass die Art sich über das ganze Gebiet verbreitet habe, welches uns von den Vereinigten Staaten trennt, wo dieselbe in weiter Verbreitung gefunden wird. Obgleich diese Idee a priori befremden kann, enthält sie doch nichts Unmögliches, wenn man die Ausdehnung und Höhe der Bergketten in Betracht zieht, welche diese Gegenden verbinden und in welchen reichlich günstige Brutstätten vorkommen müssen.

Da diese Frage nicht vollständig entschieden ist, scheint es angebracht, hier eine Beschreibung zu geben, welche unseren Exemplaren entnommen ist.

Gesamtgrösse 2—2,5 mm. Allgemeinfärbung schwärzlich.

Rüssel graubraun, behaart, Antennen bräunlich ockergelb, mit weisslicher Pubescenz; Palpen von derselben Färbung, doch etwas dunkler; Clypeus, Stirn und Scheitel silbern bestäubt, Augen goldgrün, Hinterkopf schieferfarben mit grauem Schimmer.

Rückenschild und Schildchen schieferfarben, mit goldenen haarartigen Schüppchen, die nicht sehr lang und gewöhnlich am ersteren

Pernas; primeiro par ocraceo até os joelhos, tibias da mesma côr, com exceção do apice que é pardacento e da face anterior que é coberta de escamas brancas estreitas e compridas em toda a extensão, menos nas duas extremidades; tarso preto de fulijem; segundo par, como o primeiro, mas toda a tibia branca, com alguns espinhos pretos no apice; tarsos branco-amarelados, com a porção terminal dos articulos pardacentos, o ultimo inteiramente de côr pardacenta clara; terceiro par ocraceo até os joelhos; as tibias com a porção bazal, até perto do meio, coberta de pó e pelos brancos; o resto, pardo amarelado; primeiro tarso (metatarso) branco, até perto do apice, o segundo apenas na metade bazal, o resto pardacento. Unhas da femea com um dente na baze, as do macho com dois. A ninfa tem duas vezes seis filamentos respiratorios ramificados, como a do *S. venustum* SAY, dos Estados Unidos.

5. *Simulium venustum* var. *infuscata*, n. var. Encontrei com bastante frequencia um tipo um pouco menor que se distingue pelos carateres seguintes: Todas as côres são um pouco mais carregadas e escuras; as partes ocraceas das pernas, principalmente o femur do terceiro par, mais ou menos enegrecidas; os halteres de côr ocracea, um pouco pardacenta.

Esta fórma encontrada, ora só, ora misturada com a precedente, parece reprezentar apenas variedade, tendo-se notado variações semelhantes no *S. venustum* da America do Norte; parece ser mais comum em logares elevados e com clima mais frio.

6. *S. nigrimanum* MACQ. (A especie foi descrita como *S. nigrimana* por MACQUART; não ha razão de ser a fórma feminina porque M. não escreveu *Simulia* como fazem alguns autores.)

Dou em seguida a descrição original (*Diptères exotiques nouveaux* etc. I, pg. 88):

«Long. 1 $^1/_2$. Mâle. Pieds: cuisses fauves; jambes et tarses noirâtres; premier article des tarses intermédiaires et postérieurs blanc, à extrémité noire; deuxième noir, à base blanche. Du Brésil, au nord de la Capitainerie de Saint Paul».

wenig dicht sind. Am Schildchen liegen sie teilweise quer.

Abdomen schwärzlich, das erste Segment mit ziemlich langen, randständigen goldgelben Haaren, auf der Unterseite mit hellem Schimmer.

Flügel mit langen Haaren um die Wurzel, die ersten, verdickten Adern ockergelb bis bräunlich; die anderen verwaschen bräunlich.

Halteren von sehr blasser gelblicher Wachsfarbe.

Beine: das erste Paar ockergelb bis zu den Knien, Schienen von derselben Farbe, ausgenommen die bränliche Spitze und die Vorderfläche, welche, mit Ausnahme der beiden Enden, in ihrer ganzen Ausdehnung mit langen und schmalen weissen Schuppen bedeckt ist, Tarsen russbraun; zweites Paar, wie das erste, aber die ganze Tibia weiss mit einigen schwarzen Dornen an der Spitze, Tarsen gelblichweiss mit bräunlichem Endteile, das letzte Glied ganz hellbräunlich; drittes Paar bis zu den Knien ockergelb, Basalteil der Tibien bis nahe zur Mitte weiss bestäubt und behaart, der Rest gelblich braun; der erste Tarsus (Metatarsus) bis nahe zur Spitze weiss, der zweite nur in der Basalhälfte, der Rest bräunlich. Krallen des Weibchens innen an der Basis mit einem, Zahne, die des Männchens beiderseits mit einem solchen. Die Nymphe hat zwei mal sechs Respirationsröhren, deren Verzweigung mit derjenigen von *S. venustum* SAY, aus den Vereinigten Staaten übereinstimmt.

5 a. *Simulium venustum* var. *infuscata*, n. var.

Ich fand ziemlich häufig einen etwas kleineren Typus, welcher sich durch folgende Merkmale unterschied: Alle Farben sind etwas gesättigter und dunkler; die ockergelben Teile der Beine, besonders der Schenkel des letzten Paares mehr oder weniger geschwärzt; Halteren von ockergelber, etwas bräunlicher Farbe.

Diese Form wurde bald allein, bald mit der vorigen vermischt gefunden und scheint nur eine Varietät zu repräsentiren, wie ähnliche auch bei S. venustum in Nordamerika angeführt werden; sie scheint in höher gelegenen und kälteren Gegenden häufiger zu sein.

6. *Simulium nigrimanum* MACQ. Im Originale steht «nigrimana», doch hätte diese

Creio ter observado esta especie em Avanhandava (Noroeste de S. Paulo) onde só encontrei femeas em grande numero. Dou a descrição destas:

Côr geral preta, comprimento de 3 a 3,5 mm.

Tromba e palpos pardos; os tóros das antenas ocraceos, o resto, ocraceo na baze, tornando-se logo enfuscado, coberto de pubecencia esbranquiçada; clipeo, fronte e vertice com pó alvacento.

Torax preto, escudo e escutelo com escamas piliformes de côr dourada mate dispostas em pequenos grupos; o aspeto macroscopico e mais claro que no *venustum*.

Abdome preto.

Azas muito claras, as nervuras grossas pardacentas, as outras com côr muito apagada; halteres da mesma côr branco-amarelada de cera, como no *venustum*.

Pernas: primeiro par: coxa, trocanter e femur ocraceos, o ultimo enfuscado no apice; tibia escura, a face anterior com escamas piliformes brancas; segundo par: coxa parda, trocanter e femur ocraceo, com escamas piliformes douradas, tibia parda com pelos esbranquiçados, nas extremidades de cör clara, com pelos brancos; os trez quartos superiores do metatarso brancos, com pelos brancos, o resto preto; terceiro par: coxa, trochanter, femur e tibia pardos, os dois ultimos com baze amarelada, com pelos brancos, metatarsos com os dois terços inferiores brancos com pelos brancos. Unhas sem dente, apenas com saliencia bazal conica.

7. *Simulum perflavum* E. ROUBAUD 1906. Esta especie foi considerada por COQUILLET como indentica com *S. ochraceum* WALKER, determinação que não concorda de modo completamente satisfatorio com a descrição, tal qual se acha reproduzida no livro de JOHANNSEN. Exemplares que tinha cedido ao British Museum foram descritos por ROUBAUD como *S. perflavum*. Dou em seguida a reproducção da descrição original deste autor.

♀ «D'un beau jaune d'or. Face et front argentés, antennes testacé clair Epaules et bords du thorax légèrement argentés.

Schreibweise nur Berechtigung, wenn Macquart, wie manche Autoren, den Genusnamen «Simulia» geschrieben hätte, was nicht der Fall ist. Ich gebe hier den Text der Originalbeschreibung (in *Diptères exotiques nouveaux* etc. I, pg. 88):

«Long. 1 $^1/_2$ l. Mâle. — Pieds: cuisses fauves: jambes et tarses noirâtres; premier article des tarses intermédiaires et postérieurs blanc, à extrémité noire: deuxième noir, à base blanche. Ailes blanches. — Du Brésil, au nord de la Capitainerie de Saint-Paul.»

Ich glaube, diese Art in Avanhandava (Nordwesten von São Paulo) beobachtet zu haben, wo ich jedoch nur Weibchen in grosser Zahl fand: ich gebe hier die Beschreibung derselben.

Allgemeinfärbung schwarz; Länge 3—3,5 mm.

Rüssel und Palpen braun, Antennen mit ockergelben Tori, die nächsten Basalglieder von derselben Farbe, die bald in's Braune übergeht, alle mit weisslicher Pubescenz; Clypeus, Stirn und Scheitel weisslich bestäubt.

Thorax schwarz, Scutum und Scutellum mit haarartigen Schuppen von mattgoldener Farbe, die in kleinen Gruppen angeordnet sind; macroscopisch erscheinen sie grau und heller als bei *S. venustum*.

Abdomen schwarz.

Flügel sehr hell; die verdickten Adern bräunlich, die andern von sehr verwaschener Farbe; Halteren von derselben blassgelblichen Wachsfarbe, wie bei *S. venustum*.

Beine: Erstes Paar an Coxa, Trochanter und Femur ockergelb, letzterer am Apex braun; Tibia dunkel, an der Vorderfläche mit weissen haarartigen Schuppen; zweites Paar: Coxa braun, Trochanter und Femur ockergelb, mit goldenen, haarartigen Schuppen; Tibia braun mit weisslichen Haaren, an den Enden jedoch hell und mit weissen Haaren; obere drei Viertel des Metatarsus weiss, mit weissen Haaren, der Rest schwarz; drittes Paar: Coxa, Trochanter, Femur und Tibia braun, die beiden letzteren mit gelblicher Basis und weissen Haaren; Metatarsus an den unteren zwei Dritteln weiss und weiss behaart, der Rest schwarz.

Balanciers jaune pâle. Ailes hyalines à nervures peu distinctes.

Pattes entièrement testacé pâle, sauf l'extrémité des tibias postérieurs qui est légèrement enfumée. Les tarses noirs, sauf les métatarses postérieurs qui sont pâles à extrémité noire. Expansion faible au métatarse, n'atteignant pas l'incision tarsienne.

Griffes unidentées.

Abdomen testacé, plus clair á la base, à incisions noirâtres sur les côtés des segments moyens. Les deux premiers segments avec la collerette jaune citron. Longueur 2 millimètres.

♂ Identique á la femelle par sa teinte générale. Le thorax est d'un jaune d'or plus vif; les yeux volumineux sont brun rougeâtre, l'abdomen brun velouté soyeux, les deux segments basilaires plus clairs, ainsi que l'extrémité.

Deux taches argentées sur les côtés des segments 3 et 4. Même taille.

Assez voisine de *S. ochraceum* WALKER, du Mexique, cette curieuse espèce se distingue, d'après la description, par la teinte jaune d'or uniforme du thorax, sans stries blanches; l'absence de taches noires aux fémurs et tibias, l'abdomen testacé et non noirâtre.

Origine: Brésil, État de Santo Paulo, Dr. LUTZ. (Collection du British Museum.)»

Dou em seguida descrição feita antes de conhecer o trabalho do Sr. ROUBAUD do qual só tive conhecimento nestes ultimos dias.

Femea. Côr prevalecente amarelo alaranjado, tamanho 2—3 mm.

Tromba ocracea escura; palpos ocraceos, enfuscados na parte superior onde ha pelos maiores de côr ocracea; antenas ocraceas com pubecencia prateada, clipeo, fronte, vertice e occiput com polen e pelos prateados sobre fundo côr de ardozia.

Torax, alaranjado em cima, com escamas compridas e estreitas de côr de ouro; em baixo ocraceo, mais ou menos pardacento; nas marjens das pleuras e dos lobulos protoracicos o escudo é largamente tarjado de branco prateado.

Abdome com o primeiro segmento ocra-

Krallen ohne Zahn, nur mit conischem basalen Vorsprung.

7. *Simulium perflavum* E. ROUBAUD 1906. Diese Art wurde von COQUILLET als identisch mit *S. ochraceum* WALKER angesehen, doch stimmt dieselbe nicht ganz befriedigend mit der Beschreibung überein, wie ich sie im Buche von JOHANNSEN (s. u.) wiedergegeben finde. Exemplare, welche ich dem *British Museum* gegeben hatte, wurden von ROUBAUD als *S. perflavum* beschrieben. Ich gebe hier die Originalbeschreibung dieses Autors wieder.

« ♀ D'un beau jaune d'or. Face et front argentés, antennes testacé clair. Epaules et bords du thorax légèrement argentés.

Balanciers jaune pâle. Ailes hyalines à nervures peu distinctes.

Pattes entièrement testacé pâle, sauf l'extrémité des tibias postérieurs qui est légèrement enfumée. Les tarses noirs, sauf les métatarses postérieurs qui sont pâles à l'extrémité noire. Expansion faible au métatarse, n'atteignant pas l'incision tarsienne.

Griffes unidentées.

Abdomen testacé, plus clair à la base, à incisions noirâtres sur les côtés des segments moyens. Les deux segments avec la collerette, jaune citron. Longueur, 2 millimètres.

♂ Identique â la femelle par sa teinte générale. Le thorax est d'un jaune d'or plus vif; les yeux volumineux sont brun rougeâtre, l'abdomen brun velouté soyeux, les deux segments basilaires plus clairs, ainsi que l'extrémité.

Deux tâches argentées sur les côtes des segments 3 e 4. Même taille.

Assez voisine de *S. ochraceum* WALKER, du Méxique, cette curieuse espèce se distingue, d'après la description, par la teinte jaune d'or uniforme du thorax, sans stries blanches; l'absence de taches noires aux fémurs et tibias, l'abdomen testacé et non noirâtre.

Origine: Brésil, Etat de Santo Paulo. Dr. LUTZ. (Collection du *British Museum.*)»

Ich gebe hier noch eine Beschreibung, welche ich entwarf, ohne die Arbeit des Herrn ROUBAUD zu kennen, die mir erst in den letzten Tagen zu Gesicht kam.

Weibchen. Vorwiegende Farbe orangegelb; Grösse 2—3 mm.

ceo, franjado de pelos prateados, o resto tornando-se enfuscado ou enegrecido.

Pernas ocraceas, com escamas piliformes e com pelos curtos e escassos, ora brancos, ora escuros; o apice da tibia anterior enfuscado apenas na face posterior; terço apical da tibia posterior e todo o pé anterior côr de chocolate; nos pares posteriores, os metatarsos são esbranquiçados nos dois terços bazais e o segundo tarso do par medio tambem em cerca da metade bazal; o resto dos pés é pardo-chocolate.

Azas sem caracteres especiais; halteres com o pedunculo pardo-ocraceo, o capitulo côr de cêra palido-amarelada.

O macho se distingue pelos caracteres sexuais essenciais e acessorios.

Os olhos na femea são misturados de verde e alaranjado vivo; no macho a ultima côr prevalece na parte de cima onde ha facetas maiores.

As unhas, na femea, têm pequeno dente secundario, de percepção muitas vezes bastante dificil; no macho ha dous, sendo um claro e outro escuro.

A ninfa tem oito filamentos respiratorios, saindo de trez ramificações; de uma nacem dois e das outras cada vez trez filamentos.

A larva é encontrada em abundancia perto de S. Paulo, misturada com a de *Simulium venustum*, que é menos abundante. As observações biolojicas referem-se a estas duas especies.

Dou em seguida a descrição de *Simulium ochraceum* WALKER *(Ent. Soc. Trans.* V. 332), copiada de JOHANNSEN: *Aquatic nematocerous diptera* (Albany 1903) pg. 370:

Female: Testaceous with white tomentum; head white; antennae testaceous; thorax ochraceous, with two white stripes; abdomen blackish, testaceous at the base; femora and tibia with black tips; tarsi black, testaceous towards the base. Length of body 2 mm; of wings 4,5 mm. Mexico.

Se se refere as estrias brancas ao tarjado lateral do torax, as diferenças são poucas, limitando-se apenas ás pernas, onde a descrição sumaria combina sómente com o ultimo

Rüssel dunkel ockergelb, Palpen unten ebenso, jedoch im oberen Teile, der mit längeren ockergelben Haaren besetzt ist, braun werdend; Antennen ockergelb mit silberner Pubescenz; Clypeus, Stirn, Scheitel und Hinterkopf auf schieferfarbenem Grunde silberbestäubt und -behaart.

Thorax, oben orange, mit schmalen und langen goldglänzenden Schüppchen, unten mehr oder weniger bräunlich ockergelb; am Rande der Pleuren und den Lobuli prothoracici hat der Rückenschild einen breiten silberweissen Rand.

Abdomen, das erste Segment ockergelb mit randständigen silbernen Wimperhaaren, die andern gehen ins Braune oder Schwärzliche über.

Beine ockergelb mit ziemlich spärlichen Haaren und haarartigen Schüppchen, welche bald dunkel, bald hell sind; Spitzen der vordersten Tibia nur an der Rückseite gebräunt; das Spitzendrittel der hintersten Tibia und der ganze vorderste Fuss chocoladebraun; die Metatarsen der hinteren Paare mit den beiden oberen Dritteln weiss, ebenso das zweite Tarsalglied des mittleren Paares von oben bis ungefähr zur Mitte; der Rest des Fusses ist chocoladenbraun.

Flügel ohne auffallende Merkmale; Halteren mit bräunlich ockergelbem Stamm, das Capitulum von sehr blasser gelber Wachsfarbe.

Das Männchen unterscheidet sich durch die gewöhnlichen sexuellen und accessorischen Merkmale.

Die Augen sind beim Weibchen grün mit orangerot vermischt; beim Männchen herrscht letztere Farbe im oberen, grossfacettirten Teile vor.

Die Krallen des Weibchens haben einen kleinen Secundärzahn, der manchmal ziemlich schwer zu sehen ist; beim Männchen sind es deren zwei, ein heller und ein dunkler.

Die Nymphe hat je acht fadenförmige Athmungsröhren, die an je drei Hauptstämmen entstehen, von denen einer zwei, die anderen je drei Aeste abgeben.

Die Larve wird bei São Paulo in grosser Menge gefunden und zwar an denselben Orten, wie *Simulium venustum*, welches weniger

par. O abdome concorda perfeitamente com todos os nossos exemplares conservados, podendo todavia ser mais amarelo nos exemplares frescos. A decizão ultima desta questão de identidade dependerá da comparação com o tipo de WALKER ou com exemplares provenientes do Mexico.

8. *Simulium exiguum* n. sp. Côr geral preta; tamanho 1-1,5 mm.

Tromba preta, palpos e antenas tambem, os ultimos com pubecencia branca; o resto da cabeça preto, com pequenos pelos esbranquiçados.

Torax: escudo preto aveludado, com escamas douradas, mais abundantes na parte posterior; escutelo com pelos escuros, bastante compridos na marjem e escamas douradas abundantes; em cima o fundo é mais claro com reflexo mate.

Abdome côr de chocolate, com pelos palidos no primeiro segmento.

Pernas: primeiro par enfuscado, a tibia ocracea, coberta com escamas brancas estreitas; ha outras, mais largas, sobre fundo chocolate, no femur; segundo par em geral côr de chocolate, com escamas estreitas e compridas do lado exterior do femur e da tibia, o metatarso mais claro; terceiro par: metade bazal da tibia amarela, coberta de escamas de côr nivea; os dois terços bazais do metatarso aprezentam o mesmo aspeto; o resto da perna chocolate. Unhas inermes.

Azas, como de costume; as nervuras de côr pardacenta bastante clara; halteres de côr de cêra amarelada, bastante palida.

Tenho varios exemplares do Rio Grande perto de Franca.

9. *Simulium varians* n. sp. Côr geral preta, em parte alaranjada, tamanho total cerca de 1,5 mm.

Tromba chocolate, palpos tambem; antenas ocraceas na baze, do terceiro articulo em diante mais escuras e com pubecencia esbranquiçada; clipeo, fronte e vertice com brilho de chumbo.

Torax: em cima castanho escuro aveludado, com manchas alaranjadas de fórma variada; num cazo formam trez estrias lonjitudinais,

reichlich auftritt. Die biologischen Beobachtungen beziehen sich auf diese beiden Arten.

Ich gebe hier noch die Beschreibung von *Simulium ochroceum* Walker (Ent. Soc. Lond. Trans. V, pg. 332; ich entnehme dieselben dem Buche von JOHANNSEN: *Aquatic nematocerous diptera* (Albany 1903), pg. 370.

«Female: Testaceous with white tomentum; head white; antennae testaceous; thorax ochraceous with two white stripes; abdomen blackish, testaceous at the base; femora and tibiae with black tips; tarsi blach, testaceous towards the base; wings vitreous; veins pale testaceous. Length of body 2 mm.; of wings 4,5 mm. Mexico.»

Wenn man die weissen Streifen auf den obenbeschriebenen Thoraxrand bezieht, sind die Unterschiede gering und betreffen hauptsächlich die Beine, wo die summarische Beschreibung nur beim letzten Paar ganz stimmt. Das Abdomen zeigt sich bei allen meinen conservirten Exemplaren übereinstimmend, kann jedoch in frischen Exemplaren mehr gelb sein. Die letzte Entscheidung über diese Identitätsfrage wird von einer Vergleichung mit dem Typus von WALKER oder aus Mexico stammenden Exemplaren abhängen.

8. *Simulium exiguum* n. sp. Allgemeinfärbung schwarz; Grösse 1—1,5 mm.

Rüssel und Palpen schwarz, Antennen ebenso, aber mit weisser Pubescenz; der Rest des Kopfes schwarz, mit weisslichen Härchen.

Thorax: Scutum sammtschwarz, mit schmalen goldenen Schüppchen, die im hinteren Teile dichter stehen: Schildchen am Rande mit ziemlich langen, randständigen dunklen Haaren und reichlichen goldenen Schüppchen, oben ist der Grund heller, mit mattem Schimmer.

Abdomen chocoladebraun, mit hellen Haaren am ersten Segment.

Beine: das erste Paar bräunlich, jedoch die Tibia ockergelb, mit schmalen weissen Schuppen besetzt; andere, etwas breitere, stehen am Schenkel auf braunem Grunde; zweites Paar im Ganzen chocoladefarben, mit schmalen und langen Schüppchen an der Aussenseite von Femur und Tibia, der Metatarsus heller; drittes Paar: Tibia an der oberen Hälfte gelb, mit

das quais a central é abreviada adiante e as laterais por traz; no outro ha uma larga faixa mediana e as marjens são largamente tarjadas da mesma côr; no terceiro a côr alaranjada se limita á marjem anterior e posterior; o resto do torax é preto com lijeiro brilho cinzento.

Abdome pardacento, com a baze, principalmente em baixo, tirando sobre o ocraceo escuro.

Azas, como na especie anterior; halteres alaranjados ou de amarelo pardacento pouco carregado; a baze dos pedunculos um pouco enfuscada.

Pernas em geral de côr ocracea, mais ou menos enfuscada; o femur anterior com escamas douradas sobre fundo ocraceo; a tibia, com a parte média mais clara, o resto do pé chocolate; no par médio a metade bazal da tibia e os dois terços bazais do metatarso com fundo ocraceo e escamas, ora alvacentas, ora de dourado palido; perna posterior com o femur coberto de escamas filiformes de um dourado palido; o metatarso é esbranquiçado, menos na face anterior e no terço apical que é chocolate, como o pé. As unhas parecem inermes.

Descrito de trez femeas apanhadas no Rio Grande, perto de Franca, Estado de S. Paulo.

Dou em seguida a reprodução da descrição dada por GOELDI, de especie amazonica que não póde ser identificada a uma das acima descritas.

10. *Simulium amazonicum* nov. spc. GOELDI (1905).

♀ «Imago: Colorido geral: ennegrecido. *Antennas* de 10 articulos, dos quais I e II (basaes) maiores, o ultimo (X) conico; colorido uniforme brunnaceo. *Thorax:* Lado dorsal, colorido dominante em cinzento azulado-prateado, no qual se destaca um desenho caracteristico de côr preta, com muitos lindos cabellos dourados pelo campo todo e principalmente pela margem exterior do desenho; este constitue-se: 1) de uma estria recta mediana 2) de duas linhas curvas, em fórma de semilua, combinando-se com a mediana, de maneira a formar mais ou menos um T, virado

schneeweissen Schüppchen; die oberen zwei Drittel des Metatarsus ebenso, der Rest des Beines chocoladebraun. Krallen ohne Zahn.

Flügel wie gewöhnlich; das Geäder von ziemlich heller bräunlicher Färbung; Halteren von ziemlich blasser gelblicher Wachsfarbe.

Ich besitze verschiedene Exemplare von Rio Grande bei Franca.

9. *Simulium varians* n. sp. Allgemeinfärbung schwarz, mit etwas Orange; Länge ca. 1,5 mm.

Rüssel und Palpen chocoladebraun, Antennen unten ockergelb, vom dritten Abschnitt an dunkler mit feiner weisslicher Behaarung; Clypeus, Stirn und Scheitel mit Bleiglanz.

Thorax oben sammtartig dunkelbraun, mit orange Flecken von wechselnder Form; in einem Falle bilden sie drei Längsbinden, von denen die mittlere vorn und die seitlichen hinten abgekürzt sind; im andern findet sich eine mittlere Binde und die Seiten des Scutums sind mit derselben Farbe breit gesäumt; im dritten Falle beschränkt sich das Orange auf den Vorder- und Hinterrand; der Rest des Thorax ist schwarz mit leichtem grauen Schimmer.

Abdomen bräunlich, der Basalteil besonders unten in dunkles Ockergelb übergehend.

Flügel wie bei der vorigen Art; Halteren orange oder leicht bräunlich gelb; Basalteil des Stieles etwas gebräunt.

Beine mehr oder weniger bräunlich ockergelb; vorderster Schenkel mit goldenen Schüppchen auf ockergelbem Grunde, Tibia mit hellerer Mittelpartie, der Rest des Beines braun; am mittleren Paare zeigen die Basalhälfte der Tibia und die oberen zwei Drittel des Metatarsus auf ockergelbem Grunde bald weissliche, bald hellgoldgelbe Schüppchen; das letzte Bein am Schenkel mit blass goldgelben Schüppchen; Metatarsus weisslich, ausgenommen an der Vorderseite und am Spitzendrittel, welche ebenso wie der Fuss chocoladebraun sind. Die Krallen scheinen unbewaffnet zu sein.

Die Beschreibung ist nach drei Weibchen, welche am Rio Grande, in der Nähe von Franca (Staat São Paulo) gefangen wurden.

Nachfolgend gebe ich die Uebersetzung der Beschreibung, welche GOELDI für eine Art

para frente. (Poderia-se assim fallar de 5 linhas thoracicas longitudinaes). *Pernas:* I. par: femur claro, (sómente o lado distal um pouco chamuscado) tibia toda e todo o tarso fuliginoso-escuro. II. par: clara em toda a extensão, com unica excepção talvez de serem um bocadinho chamuscadas todas as articulações, pelo lado distal, desde a tibio-tarsal; — III. par: escuro o femur, a metade distal da tibia, o ultimo quarto distal do tarso e o terço ou a metade distal dos outros articulos tarsaes. E' muito caracteristico o colorido das pernas, sobretudo o terceiro par bicolor. *Halteras* amarellas esbranquiçadas, contrastando fortemente com a côr escura do abdomen. *Azas:* bellamente irisantes, com matizes dourados: aliás moldadas conforme feitio e nervatura usuaes no genero Simulium.

(Vena cubital, com os seus dous ramos VII¹ e VII² assaz difficil de ver, mórmente a segunda). — *Abdomen* fuliginoso, aliás sem desenhos e marcas especiaes. — Dimensões: Comprimento total 2,06 mm. — Comprimento da antenna 0,35 mm. — Largura do thorax: 0,86 mm. — Comprimento do abdomen 1,12 mm. — Maior largura do abdomen 0,58 mm. — Comprimento da aza 1,6 mm. — Largura da aza 0,91 mm.

Muitos exemplares ♀ ♀ ♀ vindos de Teffé (coll. A. Ducke, Janeiro 1905), correspondendo inteiramente com numerosos individuos, colligidos no alto do *Rio Purús* e *Acre* (Dr. J. HUBER e commissão do Museu 1904—1905) e conservados em alfinetes e no alcool.»

Quando este trabalho já estava quazi terminado recebi o n.º 2 da *Zeitschrift für wissenschaftliche Insektenbiologie* (de Berlim), na qual SCHROTTKY descreve trez especies de *Simulium* do Paraguay. Parece tratar-se de duas especies novas que poderão ser encontradas em territorio brazileiro, razão pela qual dou aqui a tradução das descrições; quanto a terceira (n.º 1) desconfio tratar-se apenas do *Simulium venustum.*

Descrição orijinal:

«1. *Simulium inexorabile* n. sp.

Cabeça e torax preto com pó cinzento; abdome, em cima, cinzento de ardozia, mais escuro no meio dos segmentos, em baixo todo vom Amazonas gegeben hat, die sich mit keiner der obigen identificiren lässt:

10. *Simulium amazonicum* nov. spec. — (GOELDI 1905).

Imago: Allgemeinfärbung schwärzlich. — Antennen mit 10 Gliedern, von denen I und II (die basalen) grösser sind; der letzte (X) ist conisch; Färbung gleichmässig bräunlich. Thorax: Dorsalseite mit vorherrschend bläulich-grauer Färbung, von welcher sich eine characteristische Zeichnung in schwarzer Farbe abhebt, mit vielen hübschen, goldenen Härchen im ganzen Gesichtsfelde und besonders am äusseren Rande der Zeichnung; diese besteht: 1) aus einem geraden Mittelstreifen, 2) aus zwei gebogenen Linien in Form eines Halbmondes, die sich derart mit der mittleren verbinden, dass sie mehr oder weniger ein nach vorn gewandtes T bilden. (Man könnte so von fünf Längsstreifen auf dem Thorax sprechen.) — Beine: erstes Paar: Schenkel hell (nur die Distalseite etwas geschwärzt), die ganze Tibia und der ganze Tarsus dunkel russbraun. Zweites Paar in seiner ganzen Länge hell, vielleicht mit der einzigen Ausnahme, das alle Gelenke, vom Tibio-tarsalgelenk an, auf der distalen Seite wie ein wenig angesengt erscheinen; drittes Paar: Femur, distale Hälfte der Tibia, das letzte distale Viertel des Tarsus und distales Drittel oder Hälfte der anderen Tarsalglieder dunkel. Die Färbung der Beine ist sehr characteristisch, besonders das zweifarbige dritte Paar. Halteren: weisslichgelb, von der dunklen Farbe des Abdomens stark abstechend. — Flügel schön irisirend, mit goldenen Nuancen; sonst verhalten sich Form und Geäder wie gewöhnlich im Genus Simulium.

(Cubitalvene, mit den Aesten VII¹ und VII² ziemlich schwer zu erkennen, besonders der zweite). — Abdomen russbraun, sonst ohne besondere Flecken oder Zeichnungen. — Dimensionen: Gesamtlänge 2,06 mm. — Länge der Antennen 0,35 mm. — Breite des Thorax 0,86 mm. — Länge des Abdomens 1,12 mm. — Grösste Breite des Abdomens 0,58 mm. — Länge des Flügels 1,6 mm. — Länge des Flügels 0,91 mm.

Viele Exemplare ♀ ♀ ♀ von Teffé (Coll. A.

cinzento claro. Olhos (no animal vivo) verdes; palpos pretos, o articulo bazal esferico, coberto do lado interno com pêlos compridos; o segundo articulo um pouco mais curto que o primeiro, os dois que se seguem trez vezes mais compridos do que largos, em fórma de clava, o articulo apical comprido e filiforme. Antenas pardo-claras, em cima, com exceção dos ultimos dois a trez articulos, pardo escuras; primeiro articulo esferico, segundo tão comprido como o primeiro e com corôa apical de pelos pequenos e finos. 3 pouco menor que o 2, 4 a 10, em forma de disco, a largura mais que dupla do comprimento, 11 ponteagudo. Torax coberto de pelos escassos e muito curtos de amarelo de ouro; azas com brilho irizante intenso, halteres brancos. Pernas: I. femur amarelo pardacento, tibia branca amarelada, com o apice escuro, tarsos pretos. II. amarelo pardacento com tarsos pardo-escuros. III. femur amarelo pardacento, tibia branca na metade bazal, pardo escura na distal, metatarso branco, os outros articulos tarsais quazi pretos. O primeiro segmento abdominal com pelos amarelos de ouro na marjem, os outros segmentos canelados com depressões lonjitudinais paralelas. Comprimento 3 mm., excepcionalmente até 5 mm.

2. *Simulium paranense* n. sp.

Côr do corpo preto aveludado, os articulos das antenas 1 a 3 pardo amarelados, os outros pretos; os olhos (no animal vivo) verde pardacento; as antenas mais curtas e grossas que na especie anterior, os articulos dos palpos mais curtos e visgozos. Pernas: I. tibia, metatarso e a baze do articulo tarsal seguinte brancos, o resto preto. II. preto, metatarso branco, o ultimo quinto preto; articulo seguinte branco na baze, preto no apice. III. preto, metatarso branco, o ultimo terço preto; o articulo seguinte metade branco, metade preto; as azas hialinas e irizantes, os halteres brancos. No abdome não ha vestijio de canelação. Comprimento $2\,^1/_2$ mm.

Paraguay (alto Paraná), talvez mais espalhado.

3. *Simulium paraguayense* n. sp.

Na coloração parecido com *S. inexorabile*, Ducke, Januar 1905), vollständig übereinstimmend mit zahlreichen Individuen, welche am oberen Rio Purús und Acre (Dr. J. Huber und Museumscommission 1904/05) gesammelt und gespiesst oder in Alcohol conservirt wurden.

Als diese Arbeit schon beinahe abgeschlossen war, erhielt ich Nummer 2 der Zeitschrift für wissenschaftliche Insektenbiologie von Berlin, in welcher Schrottky drei Arten von *Simulium* aus Paraguay beschreibt. Es scheint sich um zwei neue Arten zu handeln, die wohl auch auf brasilianischem Gebiet gefunden werden könnten, wesshalb ich hier die Beschreibungen im Originale reproduziere: was die dritte (No. 1) anbetrifft, so hege ich den Verdacht, dass es sich vielleicht bloss um *Simulium venustum* handeln könnte.

Nachstehend Originalbeschreibung der Arten von Schrottky.

«1. *Simulium inexorabile* n. sp. (Say) *S. venustum.*

♀ Kopf und Thorax schwarz, grau bereift; Abdomen oben schiefergrau, in der Mitte der Segmente dunkler, unten ganz hellgrau. Augen (beim lebenden Tiere) grün; Palpen schwarz, das Basalglied kugelförmig, innen mit langen Haaren besetzt, das zweite Glied etwas kleiner, als das erste, die nächsten beiden je drei Mal so lang als breit, keulenförmig, das Apicalglied lang und fadenförmig. Antennen hellbraun, oben, mit Ausnahme der ersten 2—3 Glieder, dunkelbraun; 1. Glied kugelförmig, 2. so lang als das erste und apikal mit einem Kranz feiner Härchen, 3. nur wenig kleiner als 2., 4.—10. scheibenförmig, mehr als doppelt so breit als lang, 11. spitz. Thorax mit spärlichen, ganz kurzen, goldgelben Härchen besetzt; Flügel lebhaft irisirend, Halteren weiss. — Beine: 1. Femur bräunlichgelb, Tibia gelbweiss mit dunklem Apex, Tarsus schwarz; II. bräunlichgelb mit dunkelbraunen Tarsen; III. Femur bräunlichgelb, Tibia in der basalen Hälfte weiss, in der distalen dunkelbraun; Metatarsus weiss, übrige Tarsenglieder fast schwarz. Das erste Abdominalsegment mit goldgelben Haaren bewimpert, die übrigen Segmente längsgerieft. Länge 3 mm., ausnahmsweise bis 5 mm.

Paraguay, Argentinien, Brasilien am Paranástrom.

podendo ser diferenciado não só pelo tamanho menor, mas tambem imediatamente pelo abdome não canelado e pelo ultimo articulo das antenas, o qual no *Simulium paraguayense* não é ponteagudo mas quadrangular, tambem comparativamente muito maior. Os olhos (no animal vivo) são furta-côres, vermelho de cobre para verde. O torax é coberto com pelos pequenos de côr verde dourado; as azas são hialinas, os halteres esbranquiçados. Pernas: I. femur e tibia pardo-amarelados, tarso preto. II. pardo-amarelado com tarsos mais claros. III. femur e tibia pardo-amarelados com apice pardo-escuro, tarsos esbranquiçados, os articulos terminais mais escuros. Comprimento 2 mm.

Paraguay, Argentina no Rio Paraná, sómente na vizinhança imediata do rio.»

M. E. ROUBAUD *(Comptes Rendus d. s. de l'Acad. des Sc.,* pg. 519) divide o genero *Simulium* em dous sub-generos bazeados na formação do segundo tarso posterior e outros caracteres. Eis a sua definição.

«Le deuxième article des tarses postérieurs dans les deux sexes, allongé, linéaire, sans échancrure basilaire. Cases pupales agrégées, imparfaites. Un très-grand nombre de filaments nymphaux... S. G. I. *Pro-Simulium* E. ROUBAUD.

Le deuxième article des tarses postérieurs court, arqué, échancré dorsalement, à sa base, dans les deux sexes. Cases pupales solitaires parfaites. Filaments nymphaux en général peu nombreux... S. G. II. *Eu-Simulium.*»

Este sub-genero segundo o autor tambem tem o metatarso mais diferenciado: «Chez ces derniers en effet, l'organe présente distalement une expansion en forme de palette, qui protège la base du deuxième tarsien sur une longueur en général notable». Nas nossas especies este carater, ás vezes, como no *S. venustum* e *rubrithorax,* é bem acuzado, outras vezes, pouco, como no *S. perflavum;* em *S. nigrimanum* falta quazi completamente, mas a forma do segundo tarso sempre corresponde aos caracteres do sub-genero. Tambem a in-

2. *Simulium paranense* n. sp.

Körperfärbung sammetschwarz, die Antennenglieder 1-3 gelbbraun, die übrigen schwarz; die Augen (beim lebenden Tiere) bräunlichgrün; die Antennen sind gedrungener als bei der vorigen Art, die Palpenglieder kürzer und klobiger. Beine: I. Tibie, Metatarsus und die Basis des nächsten Tarsalgliedes weiss, der Rest schwarz; II. schwarz, Metatarsus weiss, das letzte Fünftel schwarz; das nächste Glied basal weiss, apikal schwarz; III. schwarz, Metatarsus weiss, das letzte Drittel schwarz; das nächste Glied halb weiss, halb schwarz; die Flügel sind hyalin und irisirend, die Halteren weiss. Am Abdomen keine Spur von Riefelung. Länge 2 $^1/_2$ mm.

Paraguay (Alto Paraná), vielleicht ebenfalls weiter verbreitet.

3. *Simulium paraguayense* n. sp.

In der Färbung ähnlich *S. inexorabile,* von dieser jedoch ausser durch die geringere Grösse sofort durch das nicht geriefte Abdomen, sowie das letzte Antennenglied zu unterscheiden, welches bei *S. paraguayense* nicht spitz, sondern viereckig, auch im Verhältniss bedeutend grösser ist. Die Augen sind (beim lebenden Tiere) kupferrot-grün schillernd. Der Thorax ist mit goldiggrünen Härchen besetzt; die Flügel sind hyalin, die Halteren weisslich; Beine: I. Femur und Tibie gelbbraun; Tarsus schwarz, II. gelbbraun mit helleren Tarsen, III. Femur und Tibie gelbbraun mit dunkelbraunem Apex, Tarsen weisslich, die Endglieder dunkler. Länge 2 mm.

Paraguay, Argentinien am Alto Paraná, nur in nächster Nähe des Flusses.»

M. E. ROUBAUD (*Comptes Rendus* d. s. *de l'Acad. des Sc.,* pg. 519) zerlegt das Genus *Simulium* in zwei Subgenera, die sich auf die Bildung des letzten zweiten Tarsalgliedes und andere Charactere gründen. Hier folgt seine Definition:

«Le deuxième article des tarses postérieurs dans les deux sexes, allongé, linéaire, sans échancrure basilaire. Cases pupales agrégées, imparfaites. Un très-grand nombre de filaments nymphaux . . . . . ., S. G. I. *Pro-Simulium* ROUBAUD.

Le deuxième article des tarses postérieurs

cizura dorsal é sempre prezente, ás vezes, pouco conspicua.

Durante a impressão do prezente trabalho chegou uma remessa de borrachudos, feita pelo Dr. GURGEL DO AMARAL. Procedia de *Alfenas,* no Sul de *Minas,* perto de um afluente do *Rio Grande.* De acôrdo com este fato continha um grande numero de exemplares de *S. exiguum* n. sp. sendo o resto formado por *S. nigrimanum* MACQ. Da primeira especie havia tambem dous machos, mal conservados e não mostrando nada de extraordinario.

Outra coleção foi feita pelo Dr. ARTHUR NEIVA no salto de *Itapura* perto da confluencia do *Tieté* com o *Paraná.* Continha um exemplar de *S. perflavum* ROUB. e alguns de *S. nigrimanum* MACQ. sendo tambem reprezentado (ao que me parece) o *S. venustum* SAY. O maior numero de exemplares pertencia a uma especie menor que combina bem com o *S. paraguayense* SCHROTTKY. Pertence ao subgenero *Eusimulium* e tem unhas com pequeno dente bazal pouco conspicuo.

Durante este tempo tambem verifiquei a existencia do *Simulium perflavum* no Rio de Janeiro. No Rio Tijuca as larvas e ninfas desta especie são encontradas em grande numero.

court, arqué, échancré dorsalement à sa base, dans les deux sexes. Cases pupales solitaires, parfaites. Filaments nymphaux en général peu nombreux . . . . . S. G. II. *Eu-Simulium* ROUBAUD.»

Die von mir beschriebenen Arten gehören zu dem Subgenus *Eusimilium*, bei welchem nach dem Autor auch der Metatarsus mehr differenzirt ist: «Chez ces derniers en effet, l'organe présente distalement une expansion en forme de palette, qui protège la base du deuxième tarsien sur une longueur en général notable.» — Bei unseren Species ist dieses Merkmal manchmal sehr ausgeprägt, wie bei *S. venustum* und *rubrithorax*, andere Male weniger, wie bei *S. perflavum.* Bei *S. nigrimanum* fehlt er fast völlig, aber die Form des zweiten Tarsus entspricht immer den Characteren der Untergattung. Auch die dorsale Incisur ist immer vorhanden, obwohl manchmal nicht sehr auffällig.

Nachtrag: Während des Druckes der vorstehenden Arbeit wurden noch Simulien von Dr. GURGEL DO AMARAL eingesandt. Dieselben stammten aus *Alfenas*, im Süden des Staates *Minas* und im Zuflussgebiet des *Rio Grande.* Dementsprechend fanden sich auch darunter zahlreiche Exemplare von *S. exiguum* n. sp., während der Rest aus *S. nigrimanum* MACQ. bestand. Von ersterer Art waren auch zwei schlecht erhaltene Männchen vorhanden, die nichts Auffallendes zeigten.

Eine andere Sammlung machte Dr. ARTHUR NEIVA am Wasserfalle von *Itapura*, nahe der Vereinigung des *Tieté* mit dem *Paraná.* Dieselbe enthielt ein Exemplar von *S. perflavum* ROUB. und mehrere von *S. nigrimanum* MACQ. Auch *S. venustum* SAY schien vertreten. Das Hauptcontingent wurde aber von einer kleineren Art gestellt, welche mit *S. paraguayense* SCHROTTKY gut übereinstimmt. Sie gehört zum Subgenus *Eusimulium* und hat Krallen mit kleinem oft schwer erkennbarem Basalzahne.

Unterdessen hatte ich auch Gelegenheit, *Simulium perflavum* in Rio de Janeiro nachzuweisen. Die Larven und Nymphen finden sich sehr reichlich im Rio Tijuca.

Estudos sobre a Variola

pelos

Drs. S. von Prowazek e H. de Beaurepaire Aragão

(Com 2 figuras no texto e estampas N. 7 e 8)

Variola-Untersuchungen

von

Dr. S. von Prowazek und Dr. H. de Beaurepaire Aragão

(Mit 2 Textfiguren und Tafel 7 u. 8)

A epidemia da variola no Rio, em 1908, nos proporcionou a oportunidade de fazer estudos sobre o virus produtor dessa molestia. Os rezultados das pesquizas então feitos foram rezumidamente publicados no «Münchner Medizinische Wochenschrift», n.º 44, 1908. A fórma aforistica do comunicado deu lugar a equivocos, pelo que nos decidimos a voltar ao assunto de maneira mais minucioza.

I. O produtor da variola

Para que podessemos abordar mais de perto a questão do ajente produtor da variola fizemos em primeiro lugar estudos de orientação sobre a *filtrabilidade* do virus, e assim pudemos nos convencer que o virus de pustulas recentes, desde que não esteja de mistura com grande cópia de detritos celulares, que, além de obstruir os póros, absorvem o virus atravessam os filtros de papel espesso, asbesto, BERKEFELD e UHLENHUTH. Com os filtrados assim obtidos conseguimos sempre inoculações pozitivas na cornea de coelhos. A cornea inoculada era cuidadozamente retirada, ao cabo de 48 hóras, fixada com o sublimado-alcool, incluida em parafina, e os córtes córados, no mais das vezes com a he-

Während der Variola-Epidemie in Rio 1908 bot sich uns die Gelegenheit dar, uns mit dem Virus der Variola eingehend zu beschäftigen; die damals gemeinsam gewonnenen Resultate der Untersuchung wurden vor kurzem in der Münchner medizinischen Wochenschrift (Nr. 44, 1908) publiziert. Die aphoristische Form der Mitteilung hat jedoch zu Missverständnissen Anlass gegeben und so haben wir uns entschlossen, nochmals in ausführlicher Weise über das genannte Thema Bericht zu erstatten.

I. Der Erreger der Variola

Um der Frage nach dem Erreger der Variola näher zu kommen, wurden in erster Reihe zur Orientierung verschiedene *Filtrationsversuche* mit dem Virus angestellt und wir konnten uns zunächst davon überzeugen, dass frisches Pustelvirus, das nicht mit übermässig viel Zelldetritus vermischt ist, wodurch begreiflicherweise die Poren des Filters bald verstopft werden und auch das Virus absorbiert wird, in den meisten Fällen dicke Papierfilter, Asbest-, BERKEFELD- und UHLENHUTH-Filter passiert. Wir konnten mit diesen derart gewonnenen Filtraten jederzeit positive Im-

matoxilina ferrea de HEIDENHAIN. Na maioria dos cazos puderam ser caraterizados os *corpusculos de Guarnieri,* tipicos da variola.

Esforçámo-nos por libertar, tanto quanto possivel o virus do sôro e da albumina, lavando-o radicalmente por muito tempo, o que simultaneamente, o enriquecia. Para isso conseguir, a exemplo do que já havia sido feito com o virus da *Hühnerpest,* filtrámos o material fresco atravez de camadas coloidais (agar a 3 %). Foi observada a seguinte tecnica: Um filtro de papel bem molhado com agua fiziolojica era colocado no interior dum pequeno funil a cujas paredes era fixado por um cone de platina e tornado aderente a ellas por meio da aspiração exercida pela trompa d'agua. Por 3 ou 4 vezes; sobre o filtro era lançado o agar de maneira a todo o papel ficar por elle impregnado e que um pequeno depozito do material se acumulasse no fundo. Condição capital para o sucesso da filtração é que o agar impregne igualmente toda superficie do filtro de papel, sem que se formem lacunas. Impregna-se o filtro, lançando sobre elle certa porção de agar liquefeito, girando o aparelho em pozição horizontal, de maneira que o coloide se solidifique, formando tenue camada.

Apóz solidificação do agar, lança-se sobre o filtro o filtrado, já a algum tempo obtido pela passajem atravéz do papel de material de pustulas, um pouco diluido em agua fiziologica e deixa-se filtrar por aspiração lenta durante 1 á 3 hóras. (Fig. 1).

A filtração deve ser acompanhada cuidadozamente e sob continua vijilancia, porquanto apóz a passajem das ultimas porções de liquido a camada coloidal facilmente se fende e, nesse cazo, o filtrado é inutilizavel. O tenue depozito obtido sobre a massa de agar é estendido para preparados em laminas com uma alça de platina; são estes desecados, privados do resto de sôro por lavajens sucessivas com agua distilada, de novo desecados e fixados durante algumas hóras em alcool absoluto e córados com a fucsina anilinada de LOEFFLER.

Para se obter maiores porções de filtrados procedeu-se, segundo os conselhos de GIEMSA, do seguinte modo:

pfungen an der Kaninchenkornea vornehmen. Die geimpfte Kornea wurde nach 48 Stunden sorgfältig herausgenommen, in Sublimatalkohol fixiert, in Paraffin eingebettet und die Schnitte in den meisten Fällen mit HEIDENHAINS Eisenhämatoxylin gefärbt. In der Mehrzahl der Fälle wurden in den Schnitten die auch für die Variola typischen GUARNIERI'schen *Körperchen* nachgewiesen.

Unser Bestreben ging aber dahin, das Virus möglichst von dem Serum und dem Eiweiss zu befreien, es längere Zeit gründlich zu waschen und gleichzeitig in grösseren Mengen anzureichern. Zu diesem Zwecke filtrierten wir das frische Material nach Analogie der Filtrationsversuche bei der Hühnerpest durch Kolloidschichten (Agar-Agar 3 %). Es wurde folgende Versuchsanordung getroffen: Ein mit physiologischer Kochsalzlösung benetzter Filterpapiertrichter wurde mit Hilfe eines Platinkonus in einen kleinen Glastrichter dicht durch Ansaugen mit einer Wasserstrahlpumpe sorgfältig eingefügt und dann 3—4 mal mit Agar-Agar derart durchtränkt, dass die Substanz überall den Papierrand überdeckte und an der Basis einen kleinen Agarschichtkegel bildete. Ein Haupterfordernis für gute Filtrationsresultate ist, dass die Agarsubstanz gleichmässig den Papiertrichter durchtränkt und lückenlos bedeckt; bei der Durchtränkung verfährt man derart, dass man den flüssigen Agar jedesmal aus dem Trichter, den man in horizontaler Lage rotiert, hinausgiesst und den geringen Rest des Kolloids in Form einer dünnen Schicht erstarren lässt.

Nach dem Erstarren des Agars wurde nach einiger Zeit das vorher durch Papier filtrierte, etwas mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnte Pustelmaterial unter mässigem Druck langsam in 1-3 Stunden hindurchfiltriert. (Textfigur 1).

Die Filtration muss vorsichtig unter steter Kontrolle erfolgen, weil nach dem Passieren der letzten Flüssigkeitsmenge die Kolloidgallertschicht des Agarkegels sich leicht spaltet und das Filtrat unbrauchbar wird. Der leichte Belag des Agarkegels wurde dann mit der Platinöse zu Ausstrichen verarbeitet, diese wurden hierauf getrocknet, der Serumrest

Impregnou-se repetidas vezes de agar uma vela PUKAL cortada, de maneira que, apoz solidificação do coloide, se formasse no interior della tenue e regular camada, atravez a qual se fez a filtração. Por intermedio de rolha de borracha perfurada era a vela unida a um tubo de vidro capilar de paredes espessas e que entrava no interior de um frasco de filtração. O denominado ultra filtrado é recebido em tubo de ensaio esteril. (Fig. 2).

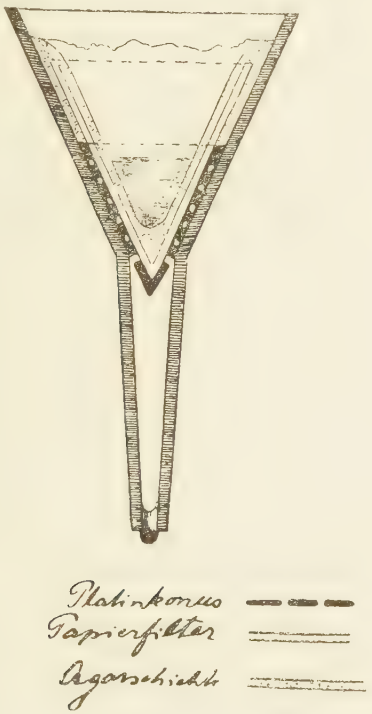


Fig. 1

Para que se obtivesse material livre de bacterios, era em alguns cazos, o conteúdo das pustulas diluido e passado atravez a vela de BERKEFELD e, assim, maior porção desse filtrado era reduzida com o filtro de coloide acima referido. Por egual processo podia-se conseguir vacina livre de bacterios. Para este fim é mister previamente triturar com cuidado o material de vacina, diluil-o, passal-o atravez um filtro de BERKEFELD e concentral-o finalmente em filtros de coloide. Em todos os cazos que pesquizámos pudémos

durch Einlegen oder Uebergiessen von Aqua destillata entfernt, abermals getrocknet, dann mehrere Stunden in Alkohol absolut fixiert und nach LÖFFLER mit Anilinfuchsin gefärbt.

Um grössere Mengen des Filtrates zu erhalten, verfuhr man nach dem Vorschlage von GIEMSA in folgender Weise: Eine abgeschnittene PUKAL-Filterkerze wurde mit Agar-Agar mehrere Male in der Weise ausgegossen, dass nach dem Erstarren des Kolloids innen eine dünne, gleichmässige Agarschicht entstand, durch welche das Virus hernach durchfiltriert wurde. Durch einen geeignet durchbohrten Gummipfropfen wurde die derart ausgegossene Kerze mit einem dickwandigen Kapillarrohr verbunden, das in das Innere einer Filtrationsflasche hineinragte. Das sogenannte

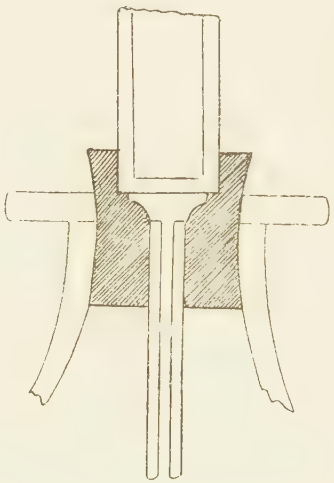


Fig. 2

Ultrafiltrat wurde in einem sterilen Reagensrohr aufgefangen. (Textfig. 2). Um bakterienfreies Material zu erhalten, wurde in einigen Fällen der verdünnte Inhalt der Pocken zuerst durch BERKEFELD-Filter filtriert und dann grössere Mengen dieses Filtrats in den oben geschilderten Kolloidfiltertrichtern eingeengt und untersucht. Auf diese Weise könnte man auch eine bakterienfreie Vaccine gewinnen. Zu diesem Zwecke ist es notwendig, das Vaccinematerial vorher sorgfältig zu zerreiben und dann verdünnt durch BERKEFELD-Filter zu fil-

verificar nos preparados córados pelo LOEFFLER corpusculos redondos, extremamente pequenos, nitidamente diferenciados, córados de vermelho escuro e que, ás vezes, se dividiam sob a fórma de *diplococos*. Eram *menores* que as menores fórmas bacterianas até hoje conhecidas. Os corpusculos da variola multiplicam-se por uma especie de bipartição depois de certo aumento de tamanho. Não tomam o GRAM; córam-se pela fucsina de ZIEHL, pela eozina-azur de GIEMSA e pela tionina. Contrariamente ao que se verifica com os estreptococos e com os nucleos dos leucócitos não se córam, mesmo apoz longo contato com o *Neutralrot* ou *Brillantkresylblau*. No estado vivo mostram-se sob fórma de pontos pequenissimos que refratam moderadamente a luz (brilhantes). Como foram estes corpos encontrados recentemente por nós, em material de variola, assim como foram elles obtidos no filtrado das velas de BERKEFELD, concentrado num filtro de coloide, com excluzão de outra qualquer fórma microbiana, e, como, com este produto obtinhamos com sucesso a inoculução da cornea de coelho, julgamo-nos autorizados a consideral-os como *microbios da variola*.

Quando efetuámos essas pesquizas já existiam sob o mesmo assunto, 3 trabalhos que se podiam relacionar com as nossas observações, de CASAGRANDI, VOLPINO e de PASCHEN. Sobre a questão de serem todas as figuras vistas identicas, diremos apenas algumas palavras, porquanto VOLPINO «(Zentralblatt f. Bakt.», Bd. 49, H. 2) já enfeixou em um artigo de sinteze os carateres de todos os corpusculos até hoje observados na variola. Julgamos que, sobretudo, se deve pôr em cotejo os corpusculos descritos por VOLPINO e PASCHEN. Nossos corpusculos assemelham-se mais, no que respeita fórma e aspeto aos descritos por VOLPINO. As caracteristicas dadas por VOLPINO concordam essencialmente com as do nosso descobrimento, a não ser que não encontrámos nos nossos corpusculos grandes movimentos comparaveis aos que se observam nos infuzorios e flajelados. Não negamos, comtudo, a existencia de certo movimento nos corpusculos em questão.

trieren und zum Schluss etwa in Kolloidsäcken einzuengen.

In allen von uns untersuchten Fällen konnten in den nach LÖFFLER gefärbten Präparaten kleinste, vollkommen scharf differenzierte, dunkelrot gefärbte, rundliche Körperchen, die sich zuweilen in *Diplokokkenform* teilten, nachgewiesen werden. Sie waren *kleiner* als die kleinsten bisher bekannten Bakterien. Die Variolakörperchen vermehren sich durch eine Art von Zweiteilung und nehmen vorher etwas *an Grösse zu*. Sie färben sich nicht nach GRAM, nehmen jedoch die Färbung mit Fuchsin nach ZIEHL, GIEMSA'S Eosin-Azur und Thionin an. Im Gegensatz zu den Streptokokken und den Kernen der Leucocyten färben sie sich selbst nach längerer Einwirkungszeit nicht mit Neutralrot oder Brillantkresylblau. Während des Lebens stellen sie winzige, mässig lichtbrechende (schimmernde) Punkte dar. Da wir sie nur in dem Pockenmaterial *konstant* gefunden haben, sowie da sie auch in den auf Kolloidschichten eingeengten Berkefeldfiltraten allein ohne irgend welche weitere Mikroorganismen vorkamen und wir mit diesen Filtraten die Kaninchenkornea mit Erfolg impfen konnten, sprechen wir sie als *Erreger der Variola* an.

Zu der Zeit als unsere Untersuchungen angestellt wurden, lagen über ähnliche Befunde, die allein mit unseren Beobachtungen in Beziehung gebracht werden können, drei Arbeiten und zwar von CASAGRANDI, VOLPINO und PASCHEN vor. Ueber die Frage, ob alle diese Gebilde miteinander identisch sind, können wir uns derzeit kurz fassen, da VOLPINO (Zentralblatt f. Bakt., 49. Bd., H. 2) alle die Merkmale der verschiedenen bis jetzt gefundenen Körperchen in einer zusammenfassenden Uebersicht dargestellt hatte. In Betracht scheinen uns besonders die Körperchen, die VOLPINO und PASCHEN beschrieben haben, zu kommen. Unsere Körperchen sind zunächst bezüglich des Aussehens und der Grösse den Körperchen von VOLPINO am ähnlichsten; die Merkmale, die VOLPINO angibt, stimmen wesentlich mit den von uns gefundenen überein, nur dass wir nicht eine grosse Beweglichkeit der Körperchen, etwa nach Art der Flagellaten und Infusorien annehmen kön-

tão, movimento analogo ao das granulações de pigmento dos parazitos da malaria por ocazião da formação dos flagelos. Os corpusculos que PASCHEN foi o primeiro a descrever na vacina e dos quais tivémos para comparação um preparado (de corpusculos da variola) são relativamente aos nossos, um pouco maiores ($^1/_2$ μ), diferença esta que PASCHEN atribue aos metodos de coloração. No começo, acreditavamos numa diferença de tamanho de virus variolozo, em relação ao vacinico; agóra, porém, já não pensamos desse modo. Qual foi o primeiro a observar os verdadeiros corpusculos, é questão hoje dificil de dicidir, por isso que para diferenciação delles quazi não existem carateristicas *morfolojicas* e as dimensões variam conforme a coloração, (PASCHEN) o modo de se fazer a preparação ou estado de conservação do material. Os corpusculos descritos, em primeiro lugar, por PROWAZEK, como corpusculos iniciais consideramol-os como estádios de dezenvolvimento do virus; PASCHEN foi o primeiro a *descrever,* de modo *indubitavel,* corpusculos menores que esses.

Os corpusculos acima descritos reprezentam como já dissemos, apenas o estádio *vejetativo* do virus variolico. Inoculando-se esse virus na cornea de coelhos, ás vezes, foram tornadas viziveis no protoplasma das celulas epiteliais figuras maiores, em via de multiplicação e que são identicas aos corpusculos iniciais anteriormente descritos. Estes ultimos estádios de dezenvolvimento acham-se incluidos, nos primeiros periodos da infeção nos *corpusculos* de GUARNIERI. e, nos córtes bem sucedidos, córados pela hematoxilina ferrea, azul VICTORIA, violeta de genciana, eozina-azur de GIEMSA, patenteam-se sob a fórma de corpusculos fortemente córados, arredondados ou alongados no interior duma especie de vacuolo dos *corpusculos* de GUARNIERI. Nelles, como já anteriormente foi referido, nota-se um certo movimento ocilatorio.

A subsequente transmutação dessa figura em *corpusculos* de GUARNIERI não foi verificada com segurança.

Os preparados de pustula variolica fixados humidos pelo sublimado alcool e córados

nen. Wir leugnen jedoch nicht eine Beweglichkeit der fraglichen Körperchen, die etwa der Bewegung der Pigmentkörner bei der Geisselung eines Malariaparasiten gleichkommt. Die Körperchen, die PASCHEN zuerst bei Vaccine beschrieben hatte und von denen uns ein Präparat von Variolakörperchen zum Vergleiche zur Verfügung stand, schienen uns im Verhältnis zu unseren Variolakörperchen etwas grösser zu sein ($^1/_2$ μ) doch meint PASCHEN, dass die Grössenunterschiede nur aus der Methode der Färbung zu erklären sind. Wir dachten anfangs an eine Grössenvariation des Variolavirus im Verhältnis zur Vaccine, doch haben wir diesen Standpunkt jetzt aufgegeben. Wer zuerst die eigentlichen Körperchen gesehen hatte, lässt sich jetzt schwer entscheiden, da für die Beurteilung der Erreger uns zunächst so gut wie keine *morphologischen* Merkmale zur Verfügung stehen und die Grössendimensionen je nach Färbung (PASCHEN), Präparation und Erhaltungszustand *schwanken.* Die zuerst von PROWAZEK beobachteten Initialkörperchen sehen wir als Entwicklungsstadien des Virus an; kleinere Körper als diese hat *zuerst* PASCHEN in *unzweideutiger* Weise beschrieben.

Die oben geschilderten Körperchen stellen, wie schon bemerkt, nur das *vegetative* Stadium des Variolavirus dar. Durch Verimpfen des Virus auf die Kaninchenkornea wurden in einigen Fällen im Protoplasma der Epithelzellen grössere, in Vermehrung begriffene Gebilde sichtbar gemacht, die mit den früher beschriebenen Initialkörperchen identisch sind. Die letzteren Entwicklungsstadien werden von den GUARNIERI'*schen Körperchen* auf der ersten Stufe der Infektion eingeschlossen und sind in günstigen Schnitten, die mit Eisenhämatoxylin, Viktoriablau, Gentianaviolett oder GIEMSA'S Eosin-Azur gefärbt wurden, als dunkel gefärbte, runde oder längliche Körperchen in einer Art von Vakuole des GUARNIERI'*schen* Körperchens beobachtet worden. Von ihnen wurde früher angegeben, dass sie unter Umständen eine oscillierende Bewegung ausführen.

Die weiteren Transmutationen dieser Gebilde im GUARNIERI'*schen Körperchen* sind noch nicht mit Sicherheit erforscht worden.

depois pela hematoxilina mostram, ao lado de muitos leucócitos poli-nucleares, ás vezes, corpos ovalares ou redondos intensamente córados e que não são mais que restos dejenerados de nucleos de leucócitos poli-nucleares. Entre esses corpos e os nucleos dos leucócitos que morrem, encontram-se todos os estádios intermediarios.

Para a interpretação dos *corpusculos* de GUARNIERI como produto de reação da celula e, mórmente, do componente plastinico do nucleo é de interesse assinalar o fato de que, nem em todos os cazos elles se assestam junto dos nucleos, como figuras independentes, mas, muitas vezes só se verifica o aumento de volume dos nucleolos. Em um cazo em que se inoculou virus variolico com sôro de variolozo de 21 dias, não se formaram *corpusculos* de GUARNIERI intraplasmaticos, mas, em compensação, os nucleolos do nucleo estavam de tal fróma aumentados que se impunham como *corpusculos* de GUARNIERI. Apoz inoculação de vacina na palpebra interna do *Gecko* póde-se verificar um aumento dos nucleolos. Respeito á biolojia do produtor da vacina consignemos aqui os seguintes fatos: o virus morre apoz um contato de 20 hóras com a saponina, bile, tauro colato e oleato de sodio; pela ação da lecitina, marca *Agfa,* seguida de $^3/_4$ de hóra de centrifugação e sedimentação de 4 hóras, obtem-se sobre a cornea de coelho apenas uma reação limitada inteiramente local. Nos leucócitos córados pelo metodo de LOEFFLER observam-se incluzões em fórma de granulos no interior de vacuolos, redondos ou ovais, nitidamente limitados e que se assemelham aos corpusculos descritos.

O denominado ultra-filtrado obtido pela passajem atravéz de camadas coloidais não continha mais virus ativo; coelhos inoculados por via subcutanea com esse produto, por 3 vezes no intervalo de 4 dias, com 2 cc. de cada vez não aprezentaram sintoma morbido algum, e não se mostraram imunes quando inoculados com o material virulento, como acontece, na *Hühnerpest,* com as galinhas inoculadas com o ultrafiltrado.

Wird Variolapustelmaterial zu Ausstrichen verarbeitet, die nach der nassen Methode mit Sublimatalkohol fixiert und hernach mit Hämatoxylin gefärbt werden, so findet man neben vielen polynucleären Leucocyten ab und zu ovale oder runde intensiv gefärbte Körper, die nichts anderes sind als degenerierte Kernreste der polynucleären Leucocyten. Zwischen diesen Körpern und den Kernen der zu Grunde gehenden Leucocyten finden sich alle Uebergänge.

Für die Beurteilung der GUARNIERI'*schen Körper* als Reaktionsprodukte der Zelle und zwar hauptsächlich der Plastinkomponente des Kernes ist die Tatsache von Interesse, dass diese nicht in allen Fällen neben dem Kern als selbständige Gebilde auftreten, sondern vielfach nur die Nucleolen vergrössert sind. In einem Falle, da Variolavirus mit 21 Tage altem Variolaserum verimpft wurde, blieb die Bildung der intraplasmatischen GUARNIERI'*schen Körperchen* aus, dagegen waren die Nucleolen der Kerne derart vergrössert, dass sie als GUARNIERI'*sche Körperchen* imponierten. Auch in der Nickhaut des *Gecko* konnte seinerzeit nach Vaccineimpfung eine Vergrösserung der Nucleolen nachgewiesen werden.

Bezüglich der Biologie des Vaccine-Erregers sei hier noch auf folgende Tatsachen hingewiesen: Durch etwa 20-stündige Einwirkung von Saponin, Galle, taurocholsaurem und ölsaurem Natrium wird das Virus abgetötet, durch Lecithin, Marke *Agfa,* durch $^3/_4$ Stunden zentrifugiert und etwa 4 Stunden sedimentiert, erhält man auf der Kaninchenkornea nur eine ganz lokale Reaktion. In den nach LÖFFLER gefärbten Leucocyten wurden kleine, ganz scharf umschriebene, runde oder ovale Lücken mit einem körnigen Einschluss, der den beschriebenen Körperchen ähnlich war, beobachtet.

Die sogenannten Ultrafiltrate, die durch eine Filtration durch Kolloidschichten gewonnen wurden, enthielten kein aktives Virus mehr; Kaninchen, die subkutan mit ihnen in Intervallen von 4 Tagen 3 mal mit je 2 ccm. behandelt wurden, zeigten keine Krankheitserscheinungen, erwiesen sich auch bei nachfolgenden Impfungen als nicht immun, ebenso

II. Circulação do virus variolico no corpo

Repetidas vezes foram feitas inoculações sobre a pele raspada do abdome e na cornea de coelhos com abundante material de sangue, sôro, extratos de baço, rins e figado de individuos que sucumbiram á variola confluente ou hemorrajica. Para obter tais extratos reduziam-se os orgãos a pesquizar a fragmentos e depois cuidadozamente se os triturava em um gral. Em alguns cazos, obtivémos apenas reações pozitivas macroscopicas. Num cazo de inoculação com sangue de variola *hemorrajica,* feita, não só nas 2 corneas de 4 coelhos, como na pele raspada do abdome obtivémos apenas numa cornea uma reação *retardada,* no fim de 6 dias e os córtes revelaram nella a prezença dos *corpusculos* de GUARNIERI. O virus, ás vezes, atravessa a placenta, e, inoculações com rezultados pozitivos foram obtidas em corneas de coelhos com o extrato de figado de feto de uma mulher falecida de variola confluente. Nas corneas assim inoculadas, puderam ser caraterizados, poucos *corpusculos* de GUARNIERI, 3 dias apoz a inoculação. E' digna de nota a circumstancia de que o feto não aprezentava sinal algum exterior da molestia.

Dessas pesquizas resalta que ha *generalização de virus variolico,* mas que, em geral, ella dura apenas um tempo determinado; e, mais tarde, apoz erupção das pustulas, apenas pela experimentação se póde verificar uma escassa circulação do virus. Segundo CALMETTE e GUERIN, mesmo apoz inoculação intravenoza o virus vacinico só circula no organismo pelo espaço de 24 hóras; durante esse tempo se póde obter uma formação artificial de pustulas vacinais, raspando ou arrancando os pêlos dos coelhos inoculados. Destas pesquizas decorrem ainda os fatos de que: 1.º o virus possue uma tendencia a encantoar-se nas celulas, aí se multiplicando, e 2.º, de que sua prezença *não é constante* nos liquidos do organismo. E' mais um *parazito da celula* que um *parazito dos liquidos organicos.* E' admiravel que com o suco obtido por expressão dos *orgãos internos,* apenas se tenham conseguido *poucos*

II. Das Kreisen des Variolavirus im Körper

Wiederholt wurde Blut, Blutserum, ferner Extrakte von Milz, Niere und Leber von an konfluirender oder hämorrhagischer Variola gestorbenen Personen auf die rasierte Bauchhaut eines Kaninchens und auf mehrere Kaninchenkorneas in grosser Menge verimpft. Die Extrakte wurden in der Weise gewonnen, dass die fraglichen Organstücke zunächst fein zerschnitten und sodann in einer Reibschale sorgfältig zerrieben wurden. Nur in einigen Fällen erhielten wir *makroskopisch* positive Reaktionen. In einem Falle von Impfung mit Blut eines *hämorrhagischen* Falles an zwei Kaninchenkorneas sowie auf die rasierte Bauchhaut eines Kaninchens trat nur auf einer Kornea erst am 6. Tage sehr *verspätet* eine Reaktion auf und es konnten sodann in Schnittpräparaten die GUARNIERI'*schen Körperchen* nachgewiesen werden. Das Virus passiert unter Umständen auch die Placenta und es wurden mit Leberextrakt eines Fötus, dessen Mutter an *Variola confluens* gestorben, positive Impfungen vorgenommen und nach 3 Tagen in der geimpften Kaninchenkornea wenige GUARNIERI'*sche Körperchen* nachgewiesen. Bemerkenswert ist der Umstand, dass der Fötus keine äusseren Krankheitserscheinungen zur Schau trug.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass eine *Generalisation des Variolavirus* zwar stattfindet, dass diese aber allgemein nur eine bestimmte Zeit dauert und dass später nach dem Ausbruch der Pusteln nurmehr ein spärliches Kreisen des Virus experimentell nachweisbar ist. Nach CALMETTE und GUERIN kreist das Vaccinevirus selbst nach intravenöser Injektion nur 24 Stunden im Organismus; während dieser Zeit kann man auch durch Rasieren oder Kahlrupfen der Haut des Kaninchens künstlich eine vaccinale Pustelbildung hervorrufen. Weiter ergibt sich aus diesen Versuchen, dass das Virus eine Tendenz besitzt, sich in den Zellen anzusiedeln und sich hier zu vermehren und dass es *nicht konstant* im

rezultados pozitivos de inoculação, emquanto que com o *material de pustulas, sem outro preparo,* foram conseguidas, *em todos os cazos, inoculações pozitivas.* Decorrem desses fatos, que carecem de ulterior verificação, que, apoz a generalização do virus da protopustulas hipoteitca de PFEIFFER, todas as celulas, segundo as pesquizas de MEYER e KEYSSELITZ respondem ao estimulo do antijeno por uma *iperplazia peculiar da substancia nucleolar,* mas que o virus se estabelece *depois, de preferencia,* no *ectoderma* ou no *tecido subcutaneo colajeno* (NOBEL e HÜCKEL) e que d'aí tambem parte a imunidade. Em favor desta maneira de vêr fala tambem a pequena quantidade ou auzencia de anticorpos no sôro sanguineo e a *imunidade cutanea* admiravelmente duradoura.

III. Os fenomenos de imunidade na variola

Em nossas pesquizas procurámos verificar como se comportaria, inoculado na cornea de coelho o sôro de convalecentes de variola, colhido 12, 14, 15, 20, 24, 30 e 40 dias apoz cicatrização das pustulas, misturado com quantidades iguais de conteúdo de pustulas variolicas, colhido, tanto quanto possivel, em pustulas frescas, e deixados em contato na geleira durante 20 a 24 hóras, sendo repetidas vezes ajitado. Demonstraram as pesquizas de VOIGT que a *variola humana* inoculada na cornea de coelhos produz sintomas tipicos não muito violentos e que se póde verificar por meio de córtes a existencia de *corpusculos* de GUARNIERI. Considerámos a auzencia desses corpusculos, na cornea como um *indice da ação paraziticida de sôro utilizado.* Seja, porém, aqui recordado que tambem na *variola humana,* nas celulas da cornea dos coelhos não se encontram sempre os *corpusculos* de GUARNIERI junto ao nucleo, mas que muitas vezes só se verifica um aumento dos nucleolos no interior do nucleo. Fatos analogos foram verificados na *cornea do homem* infetado pela variola. Uma cauza perturbadora no julgamento microscopico d'uma inoculação corneana é que, muitas vezes, com a linfa são inoculados estreptococos que produzem alte-

allgemeinen Säftekreislauf auftritt. Es ist *mehr ein Zellparasit* als *ein Säfteparasit.* Auffallend ist, dass mit den Presssäften aus *den inneren Organen nur wenige positive Impfresultate* erzielt worden sind, während wir mit dem *Pustelmaterial,* ohne *es weiter aufzuschliessen, in allen Fällen positive Impfungen* vornehmen konnten. Aus diesen noch weiter nachzuprüfenden Tatsachen folgt, dass nach der Generalisation des Virus von der hypothetischen Protopustel PFEIFFER's zwar alle Zellen nach den Untersuchungen von MAYER und KEYSSELITZ mit besonderen *Hyperplasien der Nucleolarsubstanzen* auf die Antigene antworten, dass aber das Virus sich *später vorwiegend im Ectoderm* oder in dem *kollagenen Gewebe der Subcutis* (NOBEL und HUECKEL) ansiedelt und von hier aus auch die Immunisierung stattfindet. Für diese Auffassung spricht auch der *geringe oder fehlende Antikörpergehalt im Blutserum* und die auffallend *lang andauernde kutane Immunität.*

III. Immunitätserscheinungen bei der Variola

Bei unseren Untersuchungen prüften wir zunächst das Serum von Patienten im Rekonvaleszentenstadium, also 12, 14, 15, 20, 24, 30, 40 Tage nach dem Abheilen der Pusteln, brachten dieses mit gleichen Mengen Variolapustelinhalt, der aus möglichst jungen Pusteln gewonnen wurde, auf etwa 20—24 Stunden im Eisschrank zusammen und verimpften es nach wiederholtem Durchschütteln auf die Kaninchenkornea. Nach den Untersuchungen von VOIGT ruft *Variola humana* auf der Kaninchenkornea typische, nicht zu stürmische Erscheinungen hervor und in den Schnitten kann man GUARNIERI'*sche Körperchen* nachweisen. Das Fehlen dieser Körperchen in den Schnitten sahen wir als ein *Zeichen für die parasiticide Wirkung des verwendeten Serums an.* Allerdings muss gleich hier betont werden, dass bei der *Variola humana* in den Zellen der Kaninchenkornea nicht überall neben den Kernen GUARNIERI'*sche Körperchen* liegen, sondern man findet oft blos im Kern vergrösserte Nucleolen. Analoge Verhältnisse konnten auch in den *menschlichen Korneas* bei den

rações progressivas do epitelio corneano. Macroscopicamente, a cornea reaje, em todos os cazos, da maneira uzual, já por varias vezes descrita. Microscopicamente foram *sempre* verificados os *corpusculos* de GUARNIERI, embóra em quantidade variavel. O sôro de 12 a 14 dias, de acordo com essas pesquizas não mata *definitivamente* o virus variolico. Sob a influencia do sôro de 12 dias, o numero de *corpusculos* de GUARNIERI *não era muito consideravel.* O sôro de 14 dias permitia a formação de maior cópia de corpusculos e sob a ação do sôro de 49 dias apareciam, não só aumento de volume dos nucleolos, como, se verificava junto dos nucleos a prezença dos *corpusculos* de GUARNIERI. O sôro variolico apoz um certo tempo, quando muito, enfraquece o virus e mostra, em geral, uma *auzencia de anticorpos.* Do mesmo modo, o virus variolico, não se deixa influenciar pela ação d'um sôro vacinico proveniente d'um homem alerjetico inoculado repetidas vezes, no espaço de 3 anos, assim como tambem, a vacina não é influenciada pelo sôro de variolozo de 12 dias de molestia, colhido apóz dezaparecimento dos sintomas morbidos, da maneira já referida.

Na *epidemia* que tivemos a oportunidade de observar achava-se o *virus variolico sempre associado a um estreptococo,* ajustando-se aqui entre elles, uma relação de simbioze ocazional analoga á das complicações da escarlatina, contribuindo para a gravidade de seu decurso. Inoculações feitas com esses 2 microorganismos, em series de pesquizas perfeitamente determinadas forneceram, em todos os cazos observados, rezultados muito particulares. Tratando-se corneas de coelhos com uma mistura de:

1.º Virus variolico (tanto quanto possivel material colhido em pustulas frescas)
2.º Sôro ativo (é indiferente que se tome sôro normal de homem, cavalo ou sôro vacinico ou variolico do 12.º ao 40º dia) e
3.º Estreptococos (vivos ou mortos por um aquecimento de meia hóra a 60º)

verifica-se, em comparação com as testemunhas correspondentes, que já no fim de 24

Infektionen mit Variola nachgewiesen werden. Ein anderer Uebelstand bei der mikroskopischen Beurteilung der Korneaimpfungen ist der, dass vielfach mit der Lymphe Streptokokken mit verimpft werden und derart oft weitgehende Defekte des Korneaepithels veranlassen. Makroskopisch reagierte in allen Fällen die Kornea in der üblichen, mehrfach beschriebenen Weise. Mikroskopisch wurden *immer* GUARNIERI'*sche Körperchen,* allerdings in *schwankenden* Mengenverhältnissen nachgewiesen. Das Serum von 12 bis 14 Tagen tötete auf Grund dieser Versuche das Variolavirus *nicht endgültig* ab. Die Menge der GUARNIERI'*schen Körperchen* war unter Einfluss des 12-Tageserums *nicht sehr erheblich.* Das Serum von 14 Tagen lieferte eine reichlichere Ausbeute und unter Einwirkung des 40-Tageserums waren sowohl die Nucleolen vergrössert als auch traten neben den Kernen GUARNIERI'*sche Körperchen* auf. Das Variolaserum schwächt demnach nach einem gewissen Zeitpunkt höchstens das Virus ab und zeichnet sich im allgemeinen durch einen *Mangel an Antikörpern* aus. Das Variolavirus wird in gleicher Weise nicht durch das Vaccineserum eines durch 3 Jahre wiederholt geimpften, allergetischen Menschen beeinflusst, ebensowenig beeinträchtigt das Variolaserum vom 12. Tage nach dem Aufhören der Erscheinungen die Vaccine in nennenswerter Weise.

Bei der Epidemie, die wir zu beobachten Gelegenheit hatten, war das *Variolavirus stets mit einem Streptokokkus vergesellschaftet* und bedingte so in diesem *gelegentlichen Symbioseverhältnisse ähnlich wie beim Scharlach* Komplikationen in der Schwere des Krankheitsverlaufes. Impfungen, die mit diesen *beiden* Mikroorganismen unter ganz bestimmten Versuchsanordnungen vorgenommen worden sind, lieferten in allen beobachteten Fällen ein ganz eigenartiges Resultat. Behandelt man nämlich eine Kaninchenkornea mit einer Mischung:

1. von Variolavirus (möglichst frisches Pustelmaterial),
2. aktivem Serum (es ist gleichgültig, ob man normales Menschenserum, Pferdeserum, Vaccineserum oder Variolaserum von 12 bis 14 Tagen nimmt) und

hóras ha *reações extremamente intensas* associadas com perdas progressivas do epitelio, leucocitoze e profundas erozões. As perdas epiteliais eram muitas vezes muito consideraveis e, por uma especie de citolisteze, as celulas pigmentadas do limbo corneano caminhavam centripetamente. Encontravam-se os estreptococos entre as celulas epitaliais; mais tarde, tambem, sob a fórma de acumulos entre as fibras do tecido conjuntivo sotoposto á membrana bazal. Como testemunhas foram feitas inoculações com as seguintes misturas, preparadas 24 hóras antes:

1.º Estreptococos vivos + sôros de diversas proveniencias.
2.º Virus variolico + sôros inativos de proveniencias diversas.
3.º Sôro só.
4.º Estreptococos só.
5.º Virus variolico normal, só.
6.º Virus variolico inativado, a 45º.
7.º Estreptococos + virus variolico.

Pensámos em tornar as experiencias mais exatas, empregando nas misturas acima e deixando em contato durante 24 hóras o virus variolico, préviamente passado atravéz velas de BERKEFELD. Infelizmente, estes ensaios não deram rezultados claros, porque, pelo fato da filtração, se reduzia muito a quantidade de virus. Todavia, dessas pesquizas resalta que, para que se estabeleça uma intensa reação devem coexistir 3 elementos: *virus variolico, toxina estreptococica* e a *parte termolabil* de um sôro qualquer. Estes fatos seguramente *nada* têm que vêr com a imunidade porque, em todos os cazos, nas poucas celulas epiteliais ainda conservadas se viam *corpusculos* de GUARNIERI, assim como tambem a especie de sôro uzada não tinha influencia sobre o rezultado. A *associação ocazional do virus variolico e estreptococo* pertence, segundo FRANK (Contribuição para a biolojia das plantas 1877) ao grupo dos fenomenos biolojicos, descritos sob o nome de *Simbioze,* e aqui se trate de *pseudo-parazitismo,* porque os 2 organismos são, no que toca a alimento, independentes um do outro. Elles podem tambem subzistir independentemente,

3. Streptokokken (lebend oder bei 60° C. auf eine halbe Stunde abgetötet),

so erhält man im Verhältnis zu den entsprechenden Kontrollen bereits nach 24 Stunden *äusserst stürmische Reaktionen,* verbunden mit weitgehendem Epithelverlust, Leucocytose und tiefen Erosionen. Die Epithelverluste waren oft sehr bedeutend und durch eine Art von Cytolisthesis rückten die pigmentierten Zellen des Kornearandes zentripetal vor. Die Streptokokken fand man zwischen den Epithelzellen, später aber auch nesterweise zwischen den unter der Basalmembran verlaufenden Bindegewebszügen. Zur Kontrolle wurden Impfungen mit folgenden 24 Stunden alten Mischungen vorgenommen:

1. lebende Streptokokken + verschiedenartiges Serum,
2. Variolavirus + verschiedene inaktive Sera,
3. Serum allein,
4. Streptokokken allein,
5. normales Variolavirus allein,
6. bei 45° inaktiviertes Variolavirus,
7. Streptokokken + Variola.

Die Versuche hofften wir noch in der Weise exakter zu gestalten, dass wir das Variolavirus vorher durch *Berkefeld-Filter* filtrierten und dann 24 Stunden die oben erwähnten Mischungen ansetzten. Leider fielen gerade diese Versuche nicht deutlich aus, da das Virus durch die Filtration viel *an Menge* eingebüsst hatte. Immerhin geht aus den Versuchen hervor, dass an dem Zustandekommen der stürmischen Reaktionen *3 Elemente beteiligt sind: Variolavirus, Streptokokkentoxine* und ein *thermolabiler Bestandteil* irgend eines Serums. Mit der Immunität haben die Phänomene sicherlich *nichts* zu tun, weil in allen Fällen in den wenigen noch erhaltenen Epithelzellen GUARNIERI'*sche Körperchen* nachgewiesen worden sind und auch die Art des Serums nicht ausschlaggebend war. Die *gelegentliche Vergesellschaftung von Variolavirus und Streptokokken* gehört nach FRANK (Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1877) in die Gruppe der biologischen Erscheinungen, die wir als *Symbiose* bezeichnen, und zwar handelt es sich hier um *Pseudoparasitismus,* da beide Organismen in ihrer Ernährung von *einander*

mas, se ocazionalmente vierem juntos, obram perturbando duplamente o organismo atacado. WARD (Philos. Trans. 1892) descreveu essa «associação dijuntiva» de dois organismos, que ocazionalmente exercem, um sobre o outro e de maneira tranzitoria relações de trocas, sob o nome de *Meta* ou *Antibioze (antagonismo* DE BARY). PFEFFER encararia o cazo de simbioze aqui descrito como uma simbioze dijuntiva. Relativamente á infeção do organismo devemos agrupar os fenomenos de simbioze em 3 seções:

1.º Simbiotas que absolutamente se não influenciam mutuamente nos seus modos de viver (simbiotas indiferentes).
2.º Simbiotas que ganham certa elevação de virulencia e assim prejudicam em maior escala o organismo atacado (simbiotas sinerjeticos).
3.º Simbiotas, dos quais um prepara o alimento para o outro.

Assim o *Aspergillus orizæ* ou o *Mucor orizæ* prepara o alimento para o fermento, sacarificando-lhe o amido (simbiotas antibioticos).

Ao segundo grupo pertence a simbioze aqui descrita entre o estreptococo e o virus variolico. Igual fato se verifica entre o estreptococo e o ajente produtor da escarlatina. Do mesmo modo obram sinerjicamente, segundo LECLAINCHE e VALLÉE (Ann. Institut Pasteur 1900) uma estreptotricea cromojena ou um estreptococo não patojeno, com o bacilo do carbunculo sintomatico. Ao contrario, é inativa a associação do *Bac. rhusiopathiæ sui* ou o *Bacterium coli* com o mesmo virus do carbunculo sintomatico.

A explicação mais simples e natural para a ação simbiotica de conjunto dos 2 microorganismos parece ser que, em 1.º lugar as celulas epiteliais são lezadas pelo virus variolico e reajem pela hipertrofia dum dos componentes celulares, que se relacionam microscopicamente com a substancia nuclear (*corpusculos* de GUARNIERI); em virtude desta desproporção o processo vital sofre um enfraquecimento e não póde opôr rezistencia alguma á toxina do estreptococo.

durchaus unabhängig sind. Sie können auch selbständig auftreten, gelegentlich aber zusammengebracht, wirken sie auf den befallenen Organismus doppelt zerstörend. WARD (Philos. Trans., 1892) bezeichnete diese «disjunktive Association» zweier Organismen, die in gelegentlichen, vorübergehenden Wechselbeziehungen zu einander stehen, als *Meta- oder Antibiose* (*Antagonismus* DE BARY'S). PFEFFER würde den hier beschriebenen Symbiosefall unter dem Begriff der disjunkten Symbiose zusammenfassen. In Bezug auf die Infektion des Organismus müssen wir die Erscheinungen der Symbiose in 3 Gruppen einteilen:

1. Symbionten, die durch ihre Lebensweise einander garnicht beinflussen (indifferente Symbionten),
2. Symbionten, die eine Art von Virulenzsteigerung erfahren und den befallenen Organismus in erhöhtem Masse schädigen (synergetische Symbionten),
3. Symbionten, von denen der eine dem anderen den Nährboden vorbereitet.

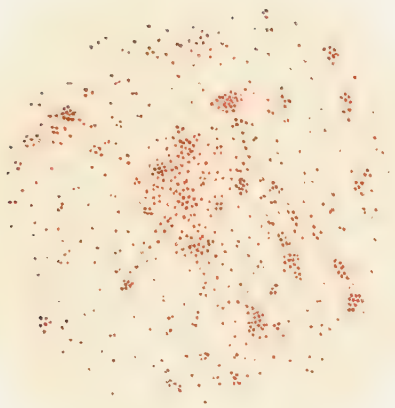
So bereitet der *Aspergillus oryzae* oder *Mucor oryzae* der Hefe den Nährboden vor, indem er vorher die Stärke verzuckert. (Antibiotische Symbionten).

In die zweite Gruppe gehört die hier beschriebene Symbiose zwischen Streptokokken und Variolavirus. Aehnliche Verhältnisse sind auch von dem Scharlacherreger und den Streptokokken bekannt. In gleicher Weise wirkt synergetisch nach LECLAINCHE und VALLÉ (Ann. Inst. Pasteur, 1900) eine chromogene Streptothrix oder ein nicht pathogener Streptokokkus in Verbindung mit dem Rauschbrandvirus. Unwirksam ist dagegen die Assoziation des Rauschbrand mit dem *Bacillus rhusiopathiæ sui* oder *Bakterium coli.*

Die einfachste und natürlichste Erklärung für das symbiotische Zusammenwirken beider Mikroorganismen scheint die zu sein, dass zunächst die Epithelzellen durch das Variolavirus geschädigt werden und durch eine Hypertrophie einer Zellkomponente, die mikroskopisch an die Nuklearsubstanzen (GUARNIERI'*sche Körperchen*) gebunden ist, reagieren; durch diese Missverhältnisse erleiden sie im

TAFEL 7

Fig. 1. Variolaertreger.
Apert. 1.30. Zeiss.



ESTAMPA 8

Fig. 2-4. Fotomicrografias do microbio da variola e estreptococcos. Ocular 8. Imersão homojena 2 mm. Abertura 1.30.
Fig. 5. Microbio da variola. Ocular 8. Imersão homojena 2 mm.
Fig. 6. It. com estreptococcos.
Fig. 7-9. Microbio do epitelioma das aves (maior que o microbio da variola).

TAFEL 8

Fig. 2-4. Mikrophotogramme von Variolaerregern und Streptokokken. Ocular 8. Homog. Immers. 2 mm. Apert. 1.30.
Fig. 5. Variolaerreger. Ocular 8. Homog. Immers. 2 mm.
Fig. 6. Dasselbe mit Streptokokken.
Fig. 7-9. Erreger des Epithelioms der Vögel (grösser als Variolaerreger).

ESTAMPA 8

Fig. 2-4. Fotomicrografias do microbio da vaniola e estreptococcos. Ocular 8. Imersão homojena 2 mm. Abertura 1.30.

Fig. 5. Microbio da vaniola. Ocular 8. Imersão homojena 2 mm.

Fig. 6. Id. com estreptococcos.

Fig. 7-9. Microbio do epithelioma das aves (maior que o microbio da vaniola).

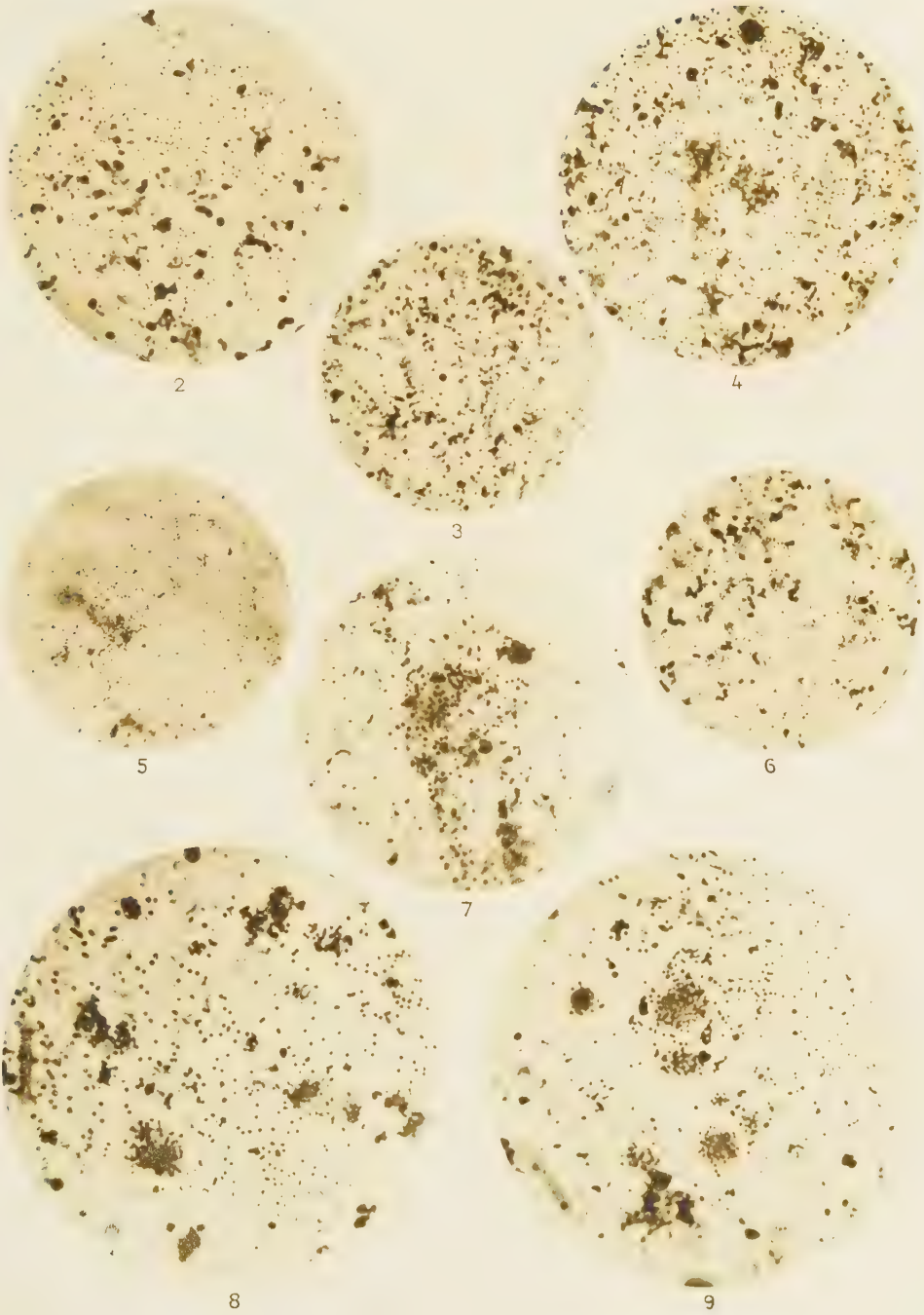
TAFEL 8

Fig. 2-4. Mikrophotogramme von Vaniola- erregern und Streptokokken. Ocular 8. Homog. Immers. 2 mm. Apert. 1.30.

Fig. 5. Vaniolaerreger. Ocular 8. Homog. Immers. 2 mm.

Fig. 6. Dasselbe mit Streptokokken.

Fig. 7-9. Erreger des Epithelioms der Vögel (grösser als Vaniolaerreger).


2
3
4
5
6
7
8
9

Nova tripanozomiaze humana.

Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem

pelo

Dr. Carlos Chagas,

Assistente.

(Estampas 9 a 13 e 10 figuras no texto)

Ueber eine neue Trypanosomiasis des Menschen.

Studien über Morphologie und Entwicklungszyklus des *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, Erreger einer neuen Krankheit des Menschen

von

Dr. Carlos Chagas,

Assistenten.

(Mit Tafeln 9—13 und 10 Textfiguren)

Introdução.

Em 1907 fomos incumbido pelo diretor Dr. OSWALDO GONÇALVES CRUZ, de executar a campanha anti-paludica nos serviços de construção da Estrada de Ferro Central do Brazil, na rejião norte do Estado de Minas Geraes. Tivemos informações da existencia ali do hematofago, denominado *barbeiro* pelos naturais da zona, que habita os domicilios humanos, atacando o homem á noite, depois de apagadas as luzes, ocultando-se, durante o dia, nas frestas das paredes, nas coberturas das cazas, em todos os esconderijos, emfim, onde possa encontrar guarida. De regra, é o hematofago visto em maior abundancia nas habitações pobres, nas choupanas de paredes não rebocadas e cobertas de capim. Ali a reprodução delle é consideravel; são encontrados em numero imenso nas frestas das paredes e constituem condição anti-vital das mais notaveis, pela dificuldade trazida ao repouzo do homem. Muita vez verificámos o ataque do homem pelo hematofago: Poucos minutos apoz a extinção da luz nos apo-

Einleitung.

Im Jahre 1907 wurde ich von Dr. OSWALDO GONÇALVES CRUZ, Leiter des Institutes von *Manguinhos* beauftragt, die Bekämpfung der Malaria bei der Konstruktion der brasilianischen Zentralbahn im Norden des Staates *Minas Geraes* zu organisieren. Daselbst hörte ich von dem Vorkommen eines gefürchteten blutsaugenden Insektes, das bei den Einwohnern als *Barbier (Barbeiro)* bekannt ist. Dasselbe lebt in den menschlichen Wohnungen, woselbst es nachts, nach Löschen der Lichter, die Bewohner angreift, während es bei Tage sich in den Spalten der Wände, in den Zimmerdecken und wo es sonst eine sichere Zuflucht findet, versteckt hält. In der Regel wird dieser Blutsauger in grösster Menge in den Wohnungen armer Leute gefunden, welche nicht getüncht und nur mit Gras gedeckt sind. Hier vermehrt derselbe sich so sehr, dass er in ungeheurer Menge auftritt und durch die Störung des Schlafes eine höchst ungünstige Wirkung ausübt. Ich war oftmals Zeuge der Angriffe dieser Blutsauger, welche in den

zentos saem elles dos esconderijos, em grande numero, e vêm picar os individuos, de preferencia no rosto. Acendendo-se o lume os hematofagos fojem rapidamente, sendo mesmo dificil, deste modo, a captura delles.

O hematofago só permanece nas habitações emquanto aí rezide o homem; das cabanas abandonadas bem depressa elle dezaparece, certo pelo fato de auzencia de alimentação.

Entre os naturais é crença geral que o hematofago é inseto silvestre, vindo á noite, para o interior das cazas, onde se domicilia e se reproduz. Si assim é, não o sabemos, porquanto, nunca nos foi dado verificar aquelle fato e tambem porque nunca encontrámos o inseto fóra de habitações humanas.

E' o hematofago referido um hemiptero heteroptero, da familia *Reduviidae,* genero *Conorhinus.* A especie é, provavelmente, *megistus* BURM. (Est. 9). O estudo do inseto, especialmente a biolojia delle, vai sendo feito na seção de zoolojia do Instituto, pelo Dr. ARTHUR NEIVA, que do assunto, quando oportuno, dará conhecimento exato.

Examinando o conteúdo do intestino posterior de exemplares de conorrinos, colhidos em Minas Geraes, no interior de habitações humanas, verificámos ali a prezença de numerozos flajelados com os carateres morfolojicos de critidias. Enviámos, então, hematofagos para o Instituto e, aí, o nosso diretor, Dr. OSWALDO CRUZ, tentou infetar um macaco da especie *Callithrix penicillata,* fazendo-o picar por diversos exemplares do hemiptero. Decorridos 20 ou 30 dias, apoz a picada, foram encontrados no sangue periferico daquelle macaco tripanozômos em grande numero, de morfolojia inteiramente diversa da de qualquer das especies conhecidas do genero *Trypanosoma.*

Iniciámos, então, o estudo do flajelado, conseguindo, desde logo, infetar por inoculação diversos animais de laboratorio, cobaias, cães, coelhos e outros macacos.

O parazito mostra-se patojenico para todos esses animais, mais para os *Callithrix* e para as cobaias e muito menos para os cães que,

Wohnräumen wenige Minuten nach Auslöschen der Lichter in grosser Zahl aus ihren Schlupfwinkeln hervorkommen und die Bewohner mit Vorliebe im Gesicht stechen. Wenn man dann das Licht anzündet, so fliehen diese Schmarotzer mit grösster Geschwindigkeit, so dass es schwer hält, sie bei dieser Gelegenheit zu fangen.

In den Wohnungen verbleiben diese Tiere nur so lange, als der Mensch sie benützt; aus verlassenen Hütten verschwinden dieselben sehr bald, wohl sicher in Folge mangelnder Nahrung.

Unter den dortigen Einwohnern herrscht allgemein die Ansicht, dass das blutsaugende Insekt ursprünglich im Walde lebt und nachts, vom Lichte angezogen, ins Innere der Häuser dringt, wo es sich niederlässt und weiter vermehrt. Ich bezweifle, dass es sich so verhält, da ich dieses Faktum nie beobachten konnte und das Insekt niemals ausserhalb menschlicher Wohnungen antraf.

Der erwähnte blutsaugende Schmarotzer gehört zu den *Hemiptera heteroptera,* zur Familie *Reduviidæ* und in das Genus *Conorhinus* (Tafel 9). Die Species ist wahrscheinlich *megistus* BURM. Das Studium dieser Insekten und insbesondere ihrer Biologie wird in der zoologischen Abteilung des Institutes von Dr. ARTHUR NEIVA ausgeführt, der darüber zu gelegener Zeit eingehend berichten wird.

Bei der Untersuchung des Hinterdarmes von *Conorhinus*wanzen, welche im Staate *Minas Geraes* im Innern menschlicher Wohnungen gesammelt waren, konstatierte ich zahlreiche Flagellaten mit den morphologischen Charakteren der *Crithidien.* Ich sandte darauf solche Wanzen an das Institut, woselbst unser Direktor, Dr. OSWALDO CRUZ, einen kleinen Affen der Species *Callithrix penicillata* zu infizieren suchte, indem er denselben von verschiedenen Exemplaren dieser Wanzenart stechen liess. 20—30 Tage nach der Application wurden im peripherischen Blute dieses Affen zahlreiche Trypanosomiden gefunden, die sich morphologisch deutlich von den anderen Arten des Genus *Trypanosoma* unterschieden.

Ich begann hierauf das Studium dieser Flagellatenart, wobei es mir gleich anfangs

quando adultos, sobrevivem longamente á infeção. O *Callithrix* e as cobaias morrem em tempo variavel, geralmente com menos de 1 mez; a cobaia em pouco mais que o *Callithrix;* o mesmo acontece ao cão novo.

Dos animais experimentados, o mais sensivel parece ser o *Callithrix.* Neste a infeção é sempre mais abundante do que nos outros animais e a ação patojenica tambem mais acentuada. Durante todo o evoluir da molestia, no *Callithrix,* como nos outros animais de laboratorio, os parazitos são vistos no sangue periferico, havendo fazes nas quais aumenta de modo sensivel o numero de flajelados, o que parece indicar multiplicação periodica.

Já em nota anterior publicada nos «Arch. für Schiffs- und Tropenhygiene» fizemos referencia ao tripanozómida que estudamos, em sua evolução no conorrino e nos animais por elle infetados, tendo denominado, nesse comunicado, o parazito *Trypanosoma cruzi.* O modo de evolver todo particular deste protozoario, como se verá no correr deste trabalho, pareceu-nos poder justificar a creação, para elle, de novo genero, o que fizemos, passando por isto a denominal-o *Schizotrypanum cruzi.*

Depois de haver estudado o duplo ciclo evolutivo do flajelado nos animais de laboratorio e no inseto transmissor e ignorando qual fosse o hospedeiro habitual do parazito, quizemos realizar novas pesquizas na zona onde haviamos encontrado os *conorhini* infetados, no intuito de esclarecer, si possivel, aquella incognita. Foi de grande exito nesse ponto, o rezultado a que chegámos, visto termos verificado ser o flajelado parazito do homem, ajente etiolojico de entidade morbida bem caraterizada. Nem o fato foi, para nós, grande surpreza, porquanto, considerando os habitos do hematofago, que só habita os domicilios humanos, e nutre-se, de preferencia, de sangue do homem, era bem de admitir, de acordo ainda com a teoria filojenetica dos hemo-flajelados, pudesse o parazito em questão infetar a especie humana. E foi raciocinando deste modo que empreendemos exames de sangue

gelang, dieselbe durch Impfung auf verschiedene Laboratoriumstiere, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunde und andere Affen zu übertragen. Der Parasit erwies sich für alle diese Tiere als pathogen, am meisten für Callithrixaffen und Meerschweinchen und viel weniger für den Hund, der, wenn erwachsen, die Infektion lange überlebt. Erstere Tiere sterben nach verschiedenen Zeiträumen, Meerschweinchen gewöhnlich vor Ablauf eines Monats und die Pinseläffchen wenig später; dasselbe beobachtet man bei jungen Hunden.

Von den Versuchstieren scheint die *Callithrix* am meisten empfindlich. Bei dieser ist die Infektion immer reichlicher und die pathogene Wirkung mehr ausgesprochen, als bei anderen Tieren. Während des ganzen Verlaufes der Krankheit aller dieser Versuchstiere erscheinen die Parasiten im peripheren Blute, indem die Zahl der Flagellaten zeitweise deutlich zunimmt, was eine periodische Vermehrung anzudeuten scheint. Ueber die Entwicklung der Trypanosomide in der Wanze und den damit infizierten Tieren habe ich im «Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene» schon vorläufig berichtet und sie «*Trypanosoma cruzi*» genannt. Die eigentümliche Entwicklung, über die ich in der vorliegenden Arbeit ausführlicher berichten werde, lässt es jedoch gerechtfertigt erscheinen, eine neue Gattung dafür aufzustellen, weshalb ich sie jetzt «*Schizotrypanum cruzi*» nenne.

Nachdem ich den doppelten Entwicklungsgang dieses Flagellaten im Versuchstiere und im übertragenden Insekte studiert hatte, ohne den gewöhnlichen Wirt zu kennen, wollte ich auch in der Zone, in welcher ich die infizierten *Conorhinus* angetroffen hatte, Untersuchungen anstellen, um, womöglich, auch dieses Problem aufzuklären. Das erhaltene Resultat erwies sich als von grosser Tragweite, da ich feststellen konnte, dass dieser Flagellat ein menschlicher Parasit und die Ursache eines eigenartigen und gut characterisierten Krankheitszustandes ist. Uebrigens war diese Tatsache für mich nicht sehr überraschend; in Anbetracht der Gewohnheiten des Parasiten, welcher nur in Wohnungen lebt und sich mit Vorliebe von menschlichem Blute ernährt,

sistematicos nos individuos domiciliados nàs cazas onde encontrámos *barbeiros;* procedemos ainda nelles a pesquizas semeioticas demoradas, afim de verificar a existencia de elementos morbidos carateristicos de tripanozomiazes. Examinámos, tambem, o sangue de animais domesticos que pernoitavam nas habitações humanas. Desde logo verificámos a existencia de tripanozómida no sangue periferico do gato.

Infeção do homem.

A historia clinica da nova especie morbida humana é ainda muito deficente, porquanto não nos foi dado acompanhar longamente doentes, estudando nelles, com a sequencia dezejavel, a sintomatolojia completa. Pouco sabemos do prognostico e das relações necessarias entre o evolver da especie morbida e o ciclo do ajente etiolojico, fatos de grande monta que vão depressa ocupar nossas pesquizas e dos quais procuraremos dar, oportunamente, minuciozo conhecimento.

No homem o que primeiro impressionou nossa atenção foi a existencia de conjunto de sintomas frequentes e uniformes, mais salientes nas creanças, sintomas que, desde logo se impunham a nosso raciocinio clinico como expressivos de entidade morbida autonoma. Eram delles os mais apreciaveis os seguintes:

Anemia profunda, com grande decadencia organica e, em muitas creanças, sensivel retardamento da evolução, e, nos adultos, infantilismo bem caraterizado; edemas, generalizados em alguns doentes, em outros, limitados a certas zonas; enfartamento ganglionar em todas as pleiades perifericas, podendo ser apreciados volumozos ganglios cervicais, axilares, crurais e inguinais; esplenomegalia, ás vezes consideravel, muito constante, sem que podesse ser atribuivel á infeção pelo impaludismo; hepatomegalia menos frequente; perturbações funcionais diversas, especialmente para o sistema nervozo, sendo de impressionar a condição inteletual precaria de muitas creanças, havendo, mesmo, muitos cazos de verdadeira imbecilidade.

konnte man — auch im Einklange mit der Theorie der phylogenetischen Entwicklung der Hämoflagellaten — annehmen, dass der fragliche Parasit den Menschen infizieren könnte. Von diesen Gedanken geleitet, unternahm ich eine systematische Blutuntersuchung bei den Bewohnern der Häuser, in welchen die «Barbeiros» gefunden wurden; zugleich nahm ich semeiotische Untersuchungen vor, um das Vorhandensein krankhafter Erscheinungen festzustellen, welche zur Kennzeichnung einer Trypanosomiasis dienen könnten. Ich untersuchte auch das Blut derjenigen Haustiere, welche in den menschlichen Wohnungen übernachteten, wobei ich gleich anfangs das Vorkommen des Trypanosoma im peripherischen Blute einer Katze konstatierte.

Die Infektion beim Menschen.

Die klinische Geschichte der neuen menschlichen Krankheitsart ist noch ungenügend, da ich nicht Gelegenheit hatte, einen Patienten längere Zeit zu beobachten und die ganze Symptomatologie mit wünschenswerter Genauigkeit zu verfolgen. Ueber die Prognose und die notwendigen Beziehungen zwischen dem Verlaufe des Krankheitsprozesses und dem Entwicklungszyklus des Erregers ist noch wenig bekannt; diese wichtigen Verhältnisse werden demnächst meine Aufmerksamkeit beschäftigen und ich hoffe, später darüber ausführlicher zu berichten.

Was beim Menschen zuerst meine Aufmerksamkeit erregte, war das Bestehen eines Komplexes von häufigen und übereinstimmenden Symptomen, welche bei Kindern auffallender waren; sie erschienen bei der klinischen Beobachtung sofort als Ausdruck einer selbständigen Krankheitseinheit. Am deutlichsten waren die folgenden zu erkennen: Hochgradige Anämie mit starkem organischen Verfall und eine im Verhältnis zum Alter auffällige Verspätung der Entwicklung mit ausgesprochenem Infantilismus; Oedeme, die bei einigen Patienten generalisiert, bei anderen auf gewisse Zonen beschränkt waren; Lymphdrüsenschwellungen, die an allen peripheren Gruppen zum Ausdruck kam, so dass ich grosse Nacken-, Achsel-, Schenkel- und Leistendrüsen beobach-

De informações cuidadozamente colhidas deduzimos ser muito grande a letalidade de creanças na zona. Referem os naturais como muito frequentes as convulsões infantis, em diversas idades, atribuindo áquelle síndrome a maioria de mortes das creanças. Ou assim é, morrem as creanças com predomio de sintomas para o lado do sistema nervozo, ou aprezentam, nos ultimos estádios de molestia fatal, verdadeira hidropizia, comparavel á da anquilostomiaze. E esse ultimo fato dá razão ás duas denominações pelas quais a molestia é conhecida pelos naturais, a de *opilação* e a de *canguary,* nomes dados pelo povo, em outras zonas onde grassa, á anquilostomiaze. Julgámos dever excluir a intervenção desta molestia do quadro morbido observado e para isso, apezar da auzencia de sinais clinicos daquella verminoze, procedémos a muitos exames de fezes, com rezultado negativo, naquelles doentes cujo aspeto morbido referimos.

Foi do modo seguinte que verificámos a infeção do homem pelo flajelado:

Em diversas habitações humanas, onde existiam *barbeiros,* em cujo intestino encontrámos abundantes fórmas de critidias, fizemos uma primeira vez exames de sangue, mais demorados nos doentes com a sintomatolojia referida. Nesta primeira pesquiza, cumpre observar, limitámo-nos a examinar, de cada doente, uma gota de sangue entre lamina e laminula, o que, de alguma fórma, justifica o rezultado negativo a que chegámos. Quatro dias depois, porém, chamado para medicar uma creança em estado grave, creança cujo sangue haviamos tambem examinado, verificámos, em pesquiza no estado vivo, a prezença de flajelados no sangue periferico. Córando preparados de sangue pelo metodo de GIEMSA concluimos ser o flajelado observado tripanozómida, de morfolojia inteiramente identica á do *Schizotrypanum cruzi,* cuja biolojia estudavamos no laboratorio, em animais inicialmente infetados por exemplares de *conorhini,* provenientes da mesma zona onde faziamos as atuais pesquizas.

Imediatamente apoz esta verificação inoculámos duas cobaias e um sagui com sangue

ten konnte; eine sehr konstante und oft beträchtliche Milzschwellung, welche nicht auf Malaria zurückgeführt werden konnte; weniger häufig Leberschwellung; endlich verschiedene funktionelle Störungen, besonders des Nervensystems, wobei namentlich der prekäre Zustand der Intelligenz auffiel, so dass sogar viele Fälle von wirklicher Imbecillität vorkamen.

Aus sorgfältig erhobenen Informationen entnahm ich, dass in der Zone die Kindersterblichkeit eine grosse war, wobei von den Einwohnern Konvulsionen als besonders häufig und auf verschiedenen Altersstufen auftretend angegeben und diesem Symptome die meisten Todesfälle unter den Kindern zugeschrieben wurden. Entweder sterben die Kinder in dieser Weise, unter vorherrschenden Symptomen von Seiten des Nervensystems, oder sie zeigen in den letzten Stadien der tödlichen Erkrankung eine wirkliche Wassersucht, welche mit derjenigen bei Ankylostomiasis vergleichbar ist. Letztere Tatsache rechtfertigt die beiden Benennungen, unter welchen die Krankheit unter den Einwohnern bekannt ist, nämlich «*Opilação*» und «*Canguary*», Namen welche von dem Volke in anderen Zonen, wo dieselbe herrscht, der Ankylostomiasis gegeben werden. Ich glaubte, den Einfluss letzterer Krankheit bei dem beobachteten Krankheitsbilde ausschliessen zu müssen und habe deshalb, ungeachtet des Fehlens klinischer Zeichen dieser Wurmkrankheit, bei Kranken mit den geschilderten Erscheinungen zahlreiche Fäkaluntersuchungen vorgenommen, welche ein negatives Resultat ergaben.

Die Infektion des Menschen durch den Flagellaten wurde von mir in folgender Weise festgestellt:

In verschiedenen menschlichen Wohnungen, wo «Barbeiros» vorkamen, in deren Darme ich reichlich *Crithidien*-formen gefunden hatte, machte ich eine erstmalige Blutuntersuchung, welche bei Patienten mit der oben angeführten Symptomatologie besonders eingehend war. Bei dieser ersten Untersuchung wurde, wie hier bemerkt sei, von jedem Patienten nur ein Blutstropfen im feuchten Deckglaspräparat untersucht, was das negative Resultat, zu dem ich gelangte, einigermassen

retirado, por punção venoza, da creança. As cobaias morreram no 6.º dia apoz a inoculação e no pulmão de ambas encontrámos fórmas parazitarias, inteiramente identicas ás que temos estudado no ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. O *Callithrix*, 8 dias depois da inoculação aprezentou na circulação periferica flajelados de morfolojia identica a do tripanozómida estudado.

Outro rezultado pozitivo foi obtido quazi simultaneamente, por inoculação do sangue de creança de 2 anos em duas cobaias. Tratava-se de doente muito anemiado, com volumozos ganglios axilares, cervicais e inguinais, esplenomegalia, edema sub-palpebral, decadencia organica acentuada. Este doente era frequentes vezes acometido de acessos febris. Em exame de gotas de sangue periferico, entre lamina e laminula, assim como em exame do material retirado dos ganglios, nada obtivemos, pelo que dado o aspeto clinico caracteristico do doente, rezolvémos tentar a inoculação de animais sensiveis. As duas cobaias morreram, uma dellas no 2.º dia, sem que podessemos verificar a prezença de parazitos, parecendo ter sido acidental a morte; a outra cobaia, porém, morreu no 9.º dia apoz a inoculação e no pulmão desta verificámos grande abundancia de fórmas parazitarias inteiramente identicas ás das cobaias da experiencia anterior. Não encontrámos no sangue periferico desta cobaia, em exame rapido, flajelados, o que significa o estado inicial da infeção e a pequena quantidade de material pesquizado.

Terceiro rezultado pozitivo foi-nos fornecido ainda por inoculação em cobaia. Tratava-se de creança de 6 anos, em condição morbida intensa, espressando-se em profunda anemia, edemas generalizados, perturbações funcionais do sistema nervozo. Ao exame fizico encontrámos grandes ganglios cervicais e axilares. O exame do sangue, em epoca de apirexia, exame de gota entre lamina e laminula, foi de rezultado negativo, pelo que inoculámos cobaia. Esta, 20 dias depois, aprezentava flajelados na circulação periferica e 2 mezes depois era intensa a infeção, tendo sobrevivido até agora o animal.

rechtfertigt. Als ich jedoch nach vier Tagen zur Behandlung eines schwer kranken Kindes gerufen wurde, dessen Blut ich schon zuvor untersucht hatte, konstatierte ich die Gegenwart lebender Flagellaten im peripheren Blute. In nach GIEMSA gefärbten Blutausstrichen erkannte ich in dem Flagellaten ein Trypanosoma, das morphologisch gänzlich übereinstimmte mit dem *Schizotrypanum cruzi*, dessen Biologie ich im Laboratorium studiert hatte und zwar an Tieren, welche ursprünglich durch *Conorhinus*-exemplare infiziert worden waren, die aus der Zone stammten, in welcher wir zur Zeit unsere Untersuchungen machten.

Nach diesem Befunde impfte ich sofort zwei Meerschweinchen und ein *Callithrix*-äffchen mit durch Venenpunktion entnommenem Blute des Kindes. Die Meerschweinchen starben am sechsten Tage nach der Impfung und in den Lungen beider wurden parasitäre Formen gefunden, welche mit den, im Entwicklungsstadium von *Schizotrypanum cruzi* studierten, vollkommen übereinstimmten. Die *Callithrix* zeigte acht Tage nach der Impfung im peripherischen Blutkreislaufe Flagellaten mit denselben Formen, wie die der studierten Trypanosomide.

Ein anderes positives Resultat wurde fast gleichzeitig erzielt, indem das Blut eines acht Jahre alten Kindes zwei Meerschweinchen eingeimpft wurde. Es handelte sich um einen Patienten mit starker Anämie, voluminösen Axillar-, Cervical- und Inguinaldrüsen, Milzschwellung, Oedem der Augenlider und ausgesprochenem organischen Verfall. Er litt auch an häufigen Fieberanfällen. Bei der Untersuchung von Tropfen des peripherischen Blutes im feuchten Präparate und ebenso bei einer solchen von Lymphdrüsenmaterial fand ich nichts, weshalb ich, im Hinblick auf das charakteristische klinische Bild des Patienten beschloss, die Uebertragung auf sensible Tiere zu versuchen. Beide Meerschweinchen starben, eines davon am zweiten Tage, ohne dass ich das Vorhandensein von Parasiten konstatieren konnte, während der Tod zufällig erfolgt zu sein schien; das andere Meerschweinchen starb dagegen am neunten Tage nach der Einimpfung und in den Lungen desselben fand

Convém afirmar a absoluta impossibilidade de infeção acidental dos animais em experiencia, os quais se achavam continuamente em gaiola de téla fina, ao abrigo de picadas de qualquer hematofago. E por outro lado, estando estes rezultados inteiramente de acordo com experiencias de laboratorio que obedeceram ao maior rigor de tecnica, izentas de qualquer cauza de erro, foram elles decizivos, dando marjem, desde logo, a concluzões definitivas.

O flajelado obtido no *Callithrix* por inoculação de sangue humano parazitado acha-se no laboratorio e tem servido para a continuação de novas pesquizas. Os *Callithrix* morrem um mez e meio apoz a inoculação com flajelados no sangue periferico e fórmas parazitarias no pulmão, identicas ás da scobaias.

Vamos referir a historia clinica dos dois doentes, em cujo sangue verificámos a prezença do *Schizotrypanum cruzi.*

I. BERENICE, de côr branca, 2 anos de idade, brazileira, nacida na mesma zona onde se encontra. A anamnese ensina: Auzencia completa de fenomenos morbidos até a prezente molestia, cujo inicio é referido á 4 mezes antes. As primeiras manifestações morbidas constaram de acessos febris intensos intermitentes, entrando a creança, desde essa ocazião, em franca decadencia organica. Depois dos primeiros ataques de reação febril a doente tinha periodos longos de apirexia, interrompidos de acessos febris de pouca duração. Não foram referidas perturbações funcionais do sistema nervozo.

Condição morbida atual: Palidez consideravel, aspeto *bouffu,* edema sub-palpebral constante e edemas fugazes na testa e membros. No primeiro exame, quando auzentes parazitos do sangue periferico, a doente achava-se apiretica; quatro dias depois, porém, quando encontrámos flajelados, a creança tornou-se febril, atinjindo a temperatura 40º, no primeiro acesso; a este seguiram-se tres outros nos dias consecutivos, começando a elevação de temperatura depois de meio dia e prolongando-se pela noite. Havia, nas primeiras horas do dia, algumas horas de apirexia.

ich eine grosse Anzahl parasitärer Formen, welche mit denjenigen des Meerschweinchens im obigen Versuche vollständig übereinstimmten. Bei einer kurzen Untersuchung fand ich im peripheren Blute dieses Meerschweinchens keine Flagellaten, was auf das Anfangsstadium der Infektion und geringe Menge des untersuchten Materials deutet.

Ich erhielt noch ein drittes positives Resultat durch die Impfung eines Meerschweinchens. Es handelte sich um ein sechsjähriges Kind in ausgesprochenem Krankheitszustande; derselbe äusserte sich in starker Anämie, generalisierten Oedemen und funktionellen Störungen von Seite des Nervensystems. Bei der Untersuchung konstatierte ich grosse Cervical- und Axillardrüsen. Die einmalige Untersuchung eines Blutstropfens unter dem Deckglase, welche während der Apyrexie vorgenommen wurde, ergab nichts, weshalb ein Meerschweinchen geimpft wurde. Dieses zeigte zwanzig Tage später Flagellaten in der peripherischen Zirkulation und zwei Monate darauf war die Infektion eine sehr lebhafte; doch ist das Tier bisher am Leben geblieben.

Es ist hier auch am Platze, die absolute Unmöglichkeit einer zufälligen Infektion der Versuchstiere anzuführen, welche sich, vor Stichen geschützt, in Käfigen von feiner Drahtgaze befanden.

Diese Ergebnisse stehen nun völlig im Einklange mit Laboratoriumsexperimenten, welche mit sorgfältigster Technik ausgeführt wurden und frei von jeder Fehlerquelle sind; so waren sie entscheidend und gestatteten ohne weiteres bestimmte Schlüsse.

Die Flagellaten, welche bei der *Callithrix* durch Einspritzung parasitenhaltigen menschlichen Blutes erhalten wurden, werden stets im Laboratorium gezüchtet und haben zur Fortsetzung neuer Versuche gedient. Der Affe starb $1^1/_2$ Monate nach der Inokulation, mit Flagellaten im peripheren Blute und Parasitenformen in den Lungen, welche mit denjenigen der Meerschweinchen übereinstimmten.

Ich gebe hier die klinische Geschichte der beiden Patienten, in deren Blute ich das Vorhandensein von *Schizotrypanum cruzi* konstatierte.

Exame fizico: Grande numero de ganglios cervicais, alguns bem volumozos, nas rejiões sub-maxilar, esterno cleido-mastoidea e na infra-clavicular. Diversos ganglios volumozos nas rejiões axilares, inguinais e crurais. Baço crecido, estando perceptivel, pela apalpação, sob a arcada costal. Area de matidez esplenica muito aumentada. Certo gráu de esplenaljia. Hepatomegalia. O figado está aumentado para cima e para baixo. Dôr á pressão do orgão, abaixo do rebordo costal e tambem no epigastrio. Aparelho urinario: Leves vestijios de albumina na urina. Micçõis normais. Sistema nervozo: Grande ajitação e delirio nos periodos de maxima elevação termica.

Sangue: Dia 14-4-09 — Tripanozómidas no sangue periferico, em numero não muito grande, sendo vistos de 15 a 20 em gota, entre lamina e laminula.

Dia 17-4-09 — A doente esteve febril durante a noite; tripanozómidas no sangue periferico, em numero sensivelmente menor que no exame anterior.

Dia 23-4-09 — A doente achava-se apiretica, desde 2 dias; tripanozómidas em menor numero, sendo com dificuldade verificaveis nos preparados vivos. Foi esta a ultima pesquiza que nos foi dado fazer nesta doente.

II. JOSÉ, de 8 anos, côr preta, nacido na zona. A anamnese refere: Estado morbido desde 2 anos, espressando-se em grande fraqueza geral, edemas mais ou menos demorados na face e membros inferiores, acessos febris periodicos. Estado atual: Esteve febril 8 dias antes do nosso exame e no momento achava-se apiretico, notando-se, porém, salientes, os seguintes sintomas morbidos: edema palpebral, grande palidez com aspeto *bouffu,* ganglios cervicais, axilares e inguinocrurais engurjitados. Esplenomegalia acentuada e tambem hepatomegalia. Auzencia de perturbações funcionais do sistema nervozo.

Sangue: Dia 14-4-09 — Exame de preparado vivo, entre lamina e laminula, negativo; assim o exame de material retirado pela punção ganglionar.

I. BERENICE, zweijährige, weisse Brasilianerin, am Orte der Untersuchung geboren. Die Anamnese ergiebt ein vollständiges Fehlen von Krankheitserscheinungen bis zum Beginne der gegenwärtigen Affektion, welche auf vier Monate früher angegeben wird. Die ersten Krankheitserscheinungen bestanden in sehr heftigen intermittierenden Fieberanfällen, wobei sich an der Kranken von dieser Zeit an ein deutlicher organischer Verfall zeigte. Nach den ersten Fieberanfällen hatte die Patientin längere Perioden von Apyrexie, die von kurz dauernden febrilen Accessen unterbrochen wurden. Funktionelle Störungen von Seite des Nervensystems wurden nicht angegeben.

Gegenwärtiger Krankheitsbefund: Bedeutende Blässe, gedunsenes Aussehen, beständiges Oedem der Augenlider und flüchtige Oedeme an Stirne und Extremitäten. Bei der ersten Untersuchung, als die Parasiten im peripheren Blute fehlten, war sie apyretisch; vier Tage darauf jedoch, als wir die Parasiten in demselben fanden, wurde das Kind fieberisch, wobei die Temperatur im ersten Anfalle 40 Grad erreichte; auf diesen folgten in den nächsten Tagen drei andere Accesse, bei welchen die Temperatursteigerung nach der Mittagsstunde eintrat und sich bis in die Nacht verlängerte. Zu Anfang des Tages gab es einige fieberfreie Stunden.

Untersuchung der Kranken: Grosse Anzahl von, zum Teil voluminösen, Drüsen am Halse, in den Submaxillar-, Sterno-cledomastoideal- und Supraclaviculargegenden. Verschiedene beträchtliche Drüsenschwellungen in den Axillar-, Inguinal- und Cruralregionen. Milz vergrössert, unter dem Rippenbogen der Palpation zugänglich; die Dämpfung deutlich erweitert, auch ein gewisser Grad von Splenalgie ist vorhanden. Leber vergrössert und zwar sowohl nach oben, wie nach unten. Beim Druck auf dieselbe unter dem Rippenbogen und im Epigastrium wird Schmerz empfunden.

Harnapparat: Leichte Spuren von Albumin im Urin. Mictionen normal.

Nervensystem: Grosse Aufregung und Delirien während der Perioden höchster Temperatursteigerung.

Blut: 14-IV-09. Trypanosomen im peri-

Dia 17-4-09 — Negativo o exame de gota entre lamina e laminula. Inoculadas nesse dia 2 cobaias com sangue obtido por punção venoza, morreram 12 dias depois e aprezentaram no pulmão grande numero de formas esquizogonicas. Este doente, como a precedente, continua sob observação clinica.

III. JOAQUINA, de 6 annos, do sexo feminino, côr parda. Doente desde 6 mezes com acessos febris irregulares. Grande decadencia organica. Edema generalizado mais acentuado no rosto e nos membros inferiores. Ganglios do pescoço, especialmente os da rejião cleido-mastoidéa, muito volumozos. Baço aumentado e dolorozo á palpação. Insonias repetidas e ajitação noturna.

Sangue: Pesquiza de gota entre lamina e laminula, negativa. Verificação da infeção pela prezença de flajelados em cobaia inoculada.

Morfolojia e evolução do Schizotrypanum cruzi no organismo dos vertebrados.

No sangue periferico dos animais infetados o *Schizotrypanum cruzi* aprezenta duas fazes distintas de evolução, a de organismos intraglobulares e a de flajelados livres no plasma.

No inicio da infeção, isto é, quando tem logar o aparecimento dos primeiros flajelados no sangue periferico, as fórmas intraglobulares são mais abundantes, sendo nesta faze, ás vezes, as unicas encontradas na circulação periférica. O aspeto dos tripanozómidas intra-globulares é variavel: ora se acham elles inteiramente incluidos no globulo vermelho, de modos diversos, formando ás vezes circulo, ou colocados transversalmente, ora têm parte incluida na hemátia e outra livre no plasma, ora, finalmente, o que é aspeto muito frequente, são vistos prezos á hemátia só pelo blefaroplasto. A incluzão de tripanozómidas em hemátias, mais abundantes no inicio da infeção é vista em menor numero, em qualquer outra faze da molestia, o que indica ser aquelle fenomeno condição biolojica no ciclo evolutivo do protozoario.

pherischen Blute in nicht sehr grosser Anzahl, indem etwa 15—20 in einem Tropfen zwischen Objectträger und Deckglass gesehen werden.

17-IV-09. Patientin hat während der Nacht Fieber gehabt; Trypanosomen im peripherischen Blute in deutlich geringerer Anzahl, als bei der letzten Untersuchung.

23-IV-09. Die Patientin ist seit zwei Tagen ohne Fieber; Trypanosomen in geringerer Zahl und im frischen Präparate nur mühsam nachzuweisen. Es war dies die letzte Untersuchung, welche ich bei der Kranken machen konnte.

II. JOSÉ, achtjähriger Mulattenjunge, in der Zone geboren.

Die *Anamnese* ergiebt:

Seit zwei Jahren ein krankhafter Zustand, der sich in grosser allgemeiner Schwäche, mehr oder weniger dauernden Oedemen im Gesicht und an den unteren Gliedmassen, sowie in periodischen Fieberanfällen äussert.

Gegenwärtiger Zustand: Acht Tage vor unserer Untersuchung hat er Fieber gehabt, gegenwärtig ist er apyretisch, dagegen treten folgende Krankheitssymptome deutlich hervor: Oedem der Augenlider, grosse Blässe mit gedunsenem Aussehen, angeschwollene Cervical-, Axillar- und Inguinocruraldrüsen. Ausgesprochene Splenomegalie und auch Leberschwellung vorhanden. Funktionelle Störungen von Seite des Nervensystems nicht nachzuweisen.

Blut: 14-IV-09. Untersuchung im frischen Zustande, negativ; ebenso eine solche von durch Drüsenpunktion erhaltenem Material.

17-IV-09. Untersuchung eines Bluttropfens im frischen Präparate negativ. Zwei mit, durch Venenpunktion erhaltenem, Blute geimpfte Meerschweinchen starben nach 12 Tagen und zeigten in den Lungen grosse Mengen von Schizogonieformen. Der Patient bleibt, wie der vorige, in klinischer Beobachtung.

III. JOAQUINA, sechsjähriges Mulattenmädchen. Seit sechs Monaten krank, mit unregelmässigen Fieberanfällen. Starker organischer Verfall. Allgemeine Oedeme, im Gesichte und an den unteren Gliedmassen mehr ausgesprochen. Ganglien des Halses, besonders der Cleido-mastoidealregion, sehr volumiös. Milz geschwollen und auf Druck empfindlich. Wie-

Desde o estádio intra-globular é bem saliente no tripanozómida dualismo morfolojico, permanecendo este em todas as fazes do ciclo evolutivo. Este dimorfismo, que se espressa mesmo nos preparados defeituozamente fixados apóz dessecamento e que melhor se carateriza, de modo exato, quando são os preparados fixados humidos, consta principalmente de diversidade de fórma e de dimensões do blefaroplasto e do nucleo, como será verificado nas descrições seguintes.

Aprezentando o tripanozómida algumas variantes morfolojicas conforme o mamifero infetado pensámos mais conveniente estudar a morfolojia do parazito adulto nos trez principais hospedeiros vertebrados, homem, sagui e cobaias, em seguida descrevendo as diversas fazes do ciclo evolutivo na cobaia e no sagui, principais animais que serviram para nossas experiencias.

Schizotrypanum cruzi no sangue periferico do homem.

Os exames do parazito no sangue de nossa primeira doente só foram feitos com fixação, apoz desecamento, e coloração pelo metodo de GIEMSA, o que ocaziona certa deficiencia nos dados morfolojicos obtidos. Verdade é que temos conhecimento exato da morfolojia do tripanozómida humano inoculado no *Callithrix,* conhecimento fornecido pela fixação a humido e coloração pela hematoxylina ferrea (metodo de ROSENBUSCH) o que vem garantir a verdade de nossa descrição.

No sangue humano observámos dois aspetos morfolojicos bem distintos do tripanozómida:

Uma das fórmas aprezenta grande blefaroplasto ovoide, colocado muito proximo ou exatamente na extremidade posterior do parazito, com o maior diametro transversal. A fixação a seco determina ver-se, de regra, saliencias laterais do blefaroplasto, o qual se aprezenta com aspeto de barra de cromatina transversal, com as partes laterais não cercadas de plasma. E' frequente observar-se, nesta fórma, como apendice do blefaroplasto

derholte Schlaflosigkeit und nächtliche Aufregung.

Blut: Untersuchung eines frischen Präparates negativ. Feststellung der Infektion durch Auffinden von Flagellaten bei einem geimpften Meerschweinchen.

Morphologie und Entwicklung des Schizotrypanum cruzi im Organismus der Wirbeltiere.

Im peripherischen Blute der infizierten Tiere zeigt das *Schizotrypanum cruzi* zwei verschiedene Entwicklungsphasen: diejenige des intraglobulären Organismus und die der im Blutplasma frei vorkommenden Flagellaten. Zum Beginne der Infektion, d. h., wenn die ersten Flagellaten im Blute erscheinen, sind die intraglobulären Formen zahlreicher vorhanden und nicht selten in dieser Phase die einzigen, welche in dem peripheren Blutkreislauf gefunden werden. Ihr Aussehen ist ein wechselndes: bald befinden sie sich im roten Blutkörperchen vollständig eingeschlossen, indem sie manchmal kreisförmig, manchmal transversal gelagert sind, bald haben sie einen Teil im Innern des Blutkörperchens und den andern frei im Plasma oder endlich, was sehr häufig zu sehen ist, sind sie nur durch den Blepharoplasten mit den Hämatien verbunden. Der Einschluss der Trypanosomen in den Blutkörperchen, welcher zu Anfang der Infektion häufiger ist, wird in den anderen Phasen der Krankheit seltener gesehen, was darauf hinweist, dass diese Erscheinung einen biologischen Zustand im Entwicklungszyklus des Protozoons darstellt.

Schon vom intraglobulären Stadium an, zeigt sich beim *Schizotrypanum* sehr deutlich ein morphologischer Dualismus, welcher in allen Entwicklungsphasen weiter besteht. Dieser Dimorphismus, welcher auch in getrockneten und mangelhaft fixierten Präparaten zum Ausdruck kommt und sich genauer und deutlicher kennzeichnet, wenn der Parasit feucht fixiert wird, zeigt sich besonders in der Verschiedenheit von Form und Dimensionen des Kernes und Blepharoplasten, wie man aus den folgenden Beschreibungen ersehen kann.

segundo elemento cromatico, a elle intimamente ligado e que corresponde ao fuzo central e ao rizoplasto bem apreciavel nos preparados fixados humidos. O nucleo principal tem geralmente fórma ovoide ou se aprezenta como longa faixa de cromatina, colocada no sentido lonjitudinal, aspeto este que parece indicar faze atrazada na evolução do nucleo. E' frequente observar-se, no interior do nucleo, corpusculo de cromatina mais intensamente córado e que corresponde ao cariozoma.

A membrana ondulante aprezenta-se com variavel numero de ondulações dependentes, naturalmente, das condições de movimento do parazito no momento da fixação. O flajelo, cuja orijem apreciavél é ou o proprio blefaroplasto ou a o elemento cromatico já citado apenso áquelle, passa de uma para outra extremidade do organismo, geralmente nas imediações do nucleo ou exatamente ao nivel deste e aprezenta porção livre de comprimento variavel, sempre mais curta que na outra fórma que vamos em seguida descrever. A extremidade anterior do parazito é afilada, sendo o flajelo livre acompanhado até certa altura por delgado prolongamento do plasma.

A outra fórma, observada no sangue humano distingue-se da precedente, sobretudo, pelo tamanho e aspeto do blefaroplasto e do nucleo.

Aqui o blefaroplasto é mais ou menos esferico situado na extremidade posterior do organismo e muito menor que a da fórma anterior não aprezentam de regra, pela tecnica uzada, apendice cromatico apreciavel.

O nucleo é tambem esferico, aprezenta a cromatina menos condensada, sendo, ás vezes, possivel observar os elementos constitutivos della separados em diversos cromozomios. Finalmente, nesta fórma o plasma aprezenta largura sensivelmente maior que na fórma anterior.

Observámos ainda, no sangue de nossa doente, um outro aspeto de tripanozómida no qual o blefaroplasto, ao contrario do que acontece no aspeto normal, acha-se muito dis-

Da die Trypanosomiden, je nach der Art des geimpften Säugetieres, einige Formverschiedenheiten zeigen, halte ich es für angebracht, die Morphologie des Parasiten in den drei Hauptwirten Mensch, *Callithrix* und Meerschweinchen zu studieren und hierauf die verschiedenen Entwicklungsphasen im Meerschweinchen und Pinseläffchen zu beschreiben, da diese Tiere hauptsächlich zu meinen Versuchen dienten.

Das Schizotrypanum cruzi im peripherischen Blute des Menschen.

Die Untersuchung des Parasiten im Blute unserer ersten Kranken wurden mit getrockneten, fixierten und nach GIEMSA gefärbten Präparaten gemacht, was eine gewisse Mangelhaftigkeit der erhaltenen morphologischen Befunde erklärt. Allerdings kannte ich die Morphologie des menschlichen Parasiten genau, da ich sie an den geimpften Aeffchen studiert hatte, wobei feuchte Fixation und Färbung mit Eisenhämatoxylin (Methode von ROSENBUSCH) zur Anwendung kam, was die Richtigkeit unserer Beschreibung garantiert. Im menschlichen Blute beobachtete ich zwei deutlich verschiedene Formen des Trypanosomiden.

Eine der Formen zeigt einen grossen, eiförmigen Blepharoplasten, welcher sehr nahe oder ganz am Hinterende des Parasiten liegt und seinen grössten Durchmesser in transversaler Richtung hat. In Folge der trockenen Fixation bilden sich in der Regel seitliche Hervorragungen des Blepharoplasten, der als transversaler Chromatinbalken erscheint, bei welchen die beiden Enden nicht vom Plasma eingefasst sind. Bei dieser Form beobachtet man häufig ein zweites Chromatinelement, das als innig verbundenes Anhängsel des Blepharoplasten erscheint und der Centralspindel und dem Basalkorn entspricht, was in feucht fixiertem Präparate sehr deutlich wird. Der Hauptkern hat gewöhnlich eine ovale Form oder erscheint als langes, in Längsrichtung gelagertes Chromatinband; die letzte Form scheint eine frühere Phase in der Entwicklung des Kernes anzudeuten. Man erkennt häufig im Innern des Nucleus ein stärker ge-

tante da extremidade posterior do organismo. Nesta fórma o nucleo aprezenta-se sempre como longa faixa lonjitudinal. Acreditamos tratar-se aqui de fórmas de evolução, nas quais a emigração do blefaroplasto para a extremidade do parazito vae-se realizando. Identico aspeto observámos algumas vezes em cobaias, inoculadas com parazitos vindos dos conorrinos.

Não raro é observar-se no sangue humano fórmas do tripanozómida incluidas nas hemátias, sendo demonstrativo deste fato a figura 28 da Est. 10.

Morfolojia do Schizotrypanum cruzi, de orijem humana, no sangue do Callithrix penicillata.

A inoculação do sangue de nossa doente BERENICE em *Callithrix penicillata* forneceu-nos intensa infeção, com abundancia do parazito no sangue periferico, de modo a termos podido estudar minuciozamente a morfolojia do tripanozómida.

Uzámos, como processo de tecnica, além da coloração pelo metodo de GIEMSA, o recente processo de ROSENBUSCH, do qual tivemos conhecimento pelo Dr. MAX HARTMANN. Consta do seguinte o metodo de coloração de ROSENBUSCH: Fixação a humido, pelo sublimado-alcool, segundo SCHAUDINN, durante vinte minutos ou meia hora; passajem dos *frottis* pelos alcooles a 70º e 95º, permanecendo de 10 a 15 minutos em cada; lavajem com agua distilada e permanencia de duas horas em solução a 3,5 % de alumen ferrico; nova lavajem em agua distilada e coloração, durante 5 minutos, em solução a 1 % de hematoxilina em alcool a 96 %, adicionada de algumas gotas de solução concentrada de carbonato de litio; lavajem dos preparados em agua corrente e diferenciação em solução aquoza a 2,5 % de alumen ferrico; dezhidratação e montajem no balsamo. A mistura córante deve aprezentar a côr de vinho tinto, sendo necessario que a solução alcoolica de hematoxilina tenha sido preparada com antecedencia nunca menor de 4 semanas. A parte mais delicada do

färbtes Chromatinkörperchen, welches dem Caryosom entspricht.

Die undulierende Membran zeigt eine wechselnde Anzahl von Ausbuchtungen, die natürlich von den Bewegungzuständen abhängen, in welchen der Parasit fixiert wurde. Die Geissel, welche, so weit man sehen kann, vom Blepharoplast selbst oder dem erwähnten Chromatinelement, welche sich an diesen anschliesst, entspringt, verläuft quer von einem zum anderen Ende des Organismus, gewöhnlich sehr nahe oder direkt im Niveau des Kernes und zeigt einen freien Teil, von wechselnder Länge, aber immer kürzer, als in der andern Form, die ich noch näher beschreiben werde. Das Vorderende des Parasiten ist zugespitzt, indem die freie Geissel bis zu einer gewissen Höhe von einem dünnen Protoplasmafortsatz begleitet ist.

Die zweite im menschlichen Blute beobachtete Form unterscheidet sich von der vorigen besonders durch Grösse und Aussehen des Blepharoplasten und des Kernes.

Hier ist der Blepharoplast mehr oder weniger rund, am Hinterende des Organismus liegend und bedeutend kleiner als bei der vorigen Form; auch zeigt er in der Regel bei der angewandten Technik kein deutliches Chromatinhängsel. Auch der Nucleus ist rund und das Chromatin erscheint weniger verdichtet, so dass man manchmal seine Zusammensetzung aus verschiedenen Chromatinkörnern unterscheiden kann. Endlich zeigt bei dieser Form das Plasma eine deutlich grössere Breite, wie in der vorigen.

Ich habe ausserdem im Blute unserer Patientin noch eine Form des Trypanosoma beobachtet, in welcher der Blepharoplast im Gegensatz zum gewöhnlichen Befunde sich sehr weit vom Hinterende des Organismus befindet; dabei zeigt sich der Kern immer als ein langes und längsgerichtetes Chromatinband. Ich halte dies für eine Entwicklungsform, in welcher die Wanderung des Blepharoplasten nach dem Hinterende des Parasiten sich eben vollzieht; einen ähnlichen Anblick beobachtete ich einigemale bei Meerschweinchen, welche mit von *Conorhinus* stammenden Parasiten geimpft waren.

processo é a diferenciação; desta depende, essencialmente, o sucesso dos preparados. Por outro lado, cumpre observar que alguns protozoarios rezistem mais á diferenciação pelo alumen, quando outros deixam escapar mais depressa a materia córante; pelo que, o gráu de diluição da substancia diferenciadora deverá variar e será conhecido para cazo especial, de acordo com ensaios realizados.

Obtivemos com este metodo de pesquizas, os melhores rezultados nas diversas fazes da evolução, tendo chegado ao conhecimento das mais finas estruturas do tripanozómida, não apreciaveis pelos outros metodos.

No *Callithrix* pelo metodo de GIEMSA, o *Schizotrypanum cruzi* aprezenta os aspetos morfolojicos descritos no sangue do doente, sendo de notar, porém, que nas fórmas de grande blefaroplasto este se aprezenta ainda maior que no sangue humano. Interessantes foram os rezultados fornecidos pelo processo de ROSENBUSCH: Bem evidente é aqui o dimorfismo do tripanozómida e, em vista do processo de fixação uzado, devemos considerar os aspetos morfolojicos verificados como absolutamente verdadeiros e não determinados por acidentes de tecnica.

Uma das fórmas do tripanozómida mostra grande blefaroplasto, quazi sempre ovoide, situado proximo da extremidade posterior do organismo; neste blefaroplasto distingue-se grande corpusculo central, esferico ou ovoide, intensamente córado, e zona externa clara, limitada por membrana delgada, de contorno, ás vezes, regular. E' a zona de suco nuclear do nucleo-blefaroplasto, como acaba de demonstrar ROSENBUSCH para diversos tripanozômos. Nos exemplares cuja fixação e coloração tenham sido bem sucedidas, observa-se, partindo do blefaroplasto, quazi sempre em ligação com o cariozoma deste, cone fibrilar de aspeto difuzo, na extremidade do qual ha pequeno corpusculo intensamente córado. Esta ultima estrutura é o fuzo central e o corpusculo da extremidade, ponto de emergencia do flajelo, é o corpusculo bazal. Esse aspeto corresponde ás observações de ROSENBUSCH; aqui, porém, com muito maior nitidez.

Nicht selten beobachtet man im menschlichen Blute auch Trypanosomenformen, die in den Blutkörperchen eingeschlossen sind, wie die Figur 28, Taf. 10 zeigt.

Morphologie des von Menschen stammenden Schizotrypanum cruzi in der Callithrix penicillata.

Die Ueberimpfung des Blutes unserer Patientin BERENICE auf eine *Callithrix penicillata* ergab eine intensive Infektion mit zahlreichen Parasiten im peripherischen Blute, so dass ich die Morphologie des *Schizotrypanum* genau studieren konnte.

Von technischen Verfahren benützte ich neben der Methode von GIEMSA auch die neue von ROSENBUSCH, deren Kenntnis ich den Vorlesungen von Dr. MAX HARTMANN verdanke. Dieselbe besteht in Folgendem: feuchte Fixierung durch Sublimalalkohol nach SCHAUDINN während 20 bis 30 Minuten, Durchführen der Ausstriche durch Alkoholgemische von 70 bis 95 Grad (bei einem Aufenthalte von 10 bis 15 Minuten in jedem derselben) und zurück; Abspülen im destillierten Wasser und zweistündigem Verweilen in einer 3,5 % Eisenalaunlösung; abermaligem Abspülen in aqua destillata und Einlegen während eines Zeitraums von 5 Minuten in eine 1 % Lösung von Hämatoxylin in 96 % Alkohol, welcher einige Tropfen einer konzentrierten Lithiumkarbonatlösung zugesetzt werden. Hierauf werden die Ausstrichpräparate in fliessendem Wasser gewaschen und in einer 2,5 % wässerigen Eisenalaunlösung differenziert; dann wird das Präparat deshydratiert und in Balsam eingeschlossen. Die Farbelösung soll eine Rotweinfarbe zeigen und die Hämatoxylinlösung wenigstens vier Wochen früher hergestellt sein.

Der delikateste Teil des Verfahrens ist die Differenzierung und davon hängt hauptsächlich das gute Resultat ab. Jedoch muss bemerkt werden, dass einige Protozoen der Differenzierung durch Alaun länger widerstehen, während andere den Farbstoff schneller abgeben; deswegen muss der Verdünnungsgrad der differenzierenden Substanz wechseln und sich in jedem Falle nach zuvorgemachten Ver-

O nucleo principal nesta fórma é ovoide, com membrana muito regular, bastante espessa, e com grande cariozoma esferico no centro. A zona de suco nuclear é quazi sempre clara, inteiramente sem cromatina, ou aprezenta raras e finas trabeculas desta substancia.

A membrana ondulante, cuja largura é igual a pouco mais do terço da largura do plasma, aprezenta pequeno numero de ondulações e não deixa, por este processo, perceber estrutura especial. O flajelo parte, em alguns exemplares, do corpusculo bazal, situado no apice do cone fibrilar; ás vezes, porém, não é perceptivel o fuzo central nem o corpusculo bazal, emerjindo, então, o flajelo diretamente da membrana do nucleo-blefaroplasto. Pode-se supor que, em tais cazos, o fuzo central dezaparece e que o corpusculo bazal se torne invizivel em consequencia de enrugamento. O plasma aprezenta, ás vezes, estrutura alveolar bem nitida; em alguns exemplares, porém, mostra estrutura mal caraterizada, de aspeto difuzo, ou mais ou menos reticular. As extremidades do parazito são afiladas, ponteagudas.

A outra forma distingue-se da precedente pelo tamanho muito menor do blefaroplasto e pelo aspeto do nucleo. Aqui, o nucleo-blefaroplasto, ora esferico, ora ovoide, aprezenta ainda um corpusculo central (cariozoma), menor que o da forma precedente, cercado de zona clara, em cuja periferia existe circulo de substancia cromatica, com o aspeto de membrana. Partindo do cariozoma do blefaroplasto, é geralmente vizivel o fuzo central, com o corpusculo bazal na extremidade.

O nucleo é esferico, com cariozoma central menor que na forma precedente; zona de suco nuclear clara, sem substancia cromatica e membrana espessa. E' frequente nesta forma observar-se condição nuclear curioza, similar á verificada por JOLLOS nos coccidios e por ZÜLZER nos heliozoarios. Os nucleos (Est. 13, fig. 1, 5, 6 e 7) aprezentam-se muitas vezes em estado de mitoze sem que seja observado qualquer outro estádio de divizão nos outros pontos do organismo celular. E' mitoze precoce do nucleo, precedendo a esquizogonia do parazito, fenomeno atualmente conhecido em citosuchen richten. Mit dieser Untersuchungsmethode erhielt ich bei verschiedenen Entwicklungsstadien die besten Resultate und erkannte die feinsten Strukturen des *Schizotrypanum*, welche bei den anderen Methoden nicht zu beobachten waren.

Nach der Methode von GIEMSA zeigt das *Schizotrypanum cruzi* die im Blute der Patientin geschilderten Formen auch bei der *Callithrix*; doch ist zu bemerken, dass bei den Formen mit grossen Blepharoplasten dieser noch grösser erscheint, als im menschlichen Blute. Sehr interessant waren die Ergebnisse der Methode von ROSENBUSCH: hier zeigt sich der Dimorphismus des Trypanosomiden sehr deutlich und im Hinblick auf die angewandte Fixierungsart kann man die beobachteten morphologischen Bilder als natürliche und nicht durch technische Zufälligkeiten verursachte ansehen.

Eine der Trypanosomenformen zeigt einen grossen, fast immer eiförmigen Blepharoplasten am Hinterende des Organismus, in welchem man einen grossen runden oder eiförmigen Centralkörper erkennt, welcher intensiv gefärbt ist; ferner eine äussere helle Zone, welche durch eine dünne Membran mit nicht selten ganz regelmässigem Umrisse begrenzt wird. Es ist dies die Kernsaftzone des Blepharoplastkernes, wie dies ROSENBUSCH neuerdings für verschiedene Trypanosomen gezeigt hat.

An solchen Exemplaren, bei welchen Fixation und Färbung gut gelungen sind, beobachtet man vom Blepharoplasten ausgehend und fast immer in Verbindung mit dem Caryosom desselben, einen faserigen Kegel von diffusem Aussehen, der an seinem Ende ein stark gefärbtes Körperchen trägt. Dieses Strukturelement ist eine Centralspindel und das endständige Körperchen, von den die Geissel entspringt, ist das Basalkörperchen. Auch dies entspricht den Befunden von ROSENBUSCH, ist in unsern Falle aber noch deutlicher.

Bei dieser Form ist der Hauptkern eiförmig, mit regelmässiger dickerer Membran und einem grossen runden Caryosom im Zentrum. Die Kernsaftzone ist fast immer hell, ganz ohne Chromatin oder schliesst nur wenige und feine Bälkchen dieser Substanz ein. Die undulierende Membran, deren Breite etwas mehr als

lojia de protozoarios. Diversos dos nossos dezenhos registam este fato e num delles (Est. 13, fig. 1) observa-se, bem nitida a divizão do centriolo com formação do fuzo central (*Centralspindel*); as duas metades do nucleo são deziguais, o que não indica, como poderia parecer á primeira vista, divizão heteropolar, mas deve antes significar dezigualdade na evolução das duas partes do nucleo, como é de regra observar, segundo JOLLOS, no coccidio «*Adelea ovata*». Permanece, nesta figura, ainda intata a membrana nuclear, apezar de quazi completa a divizão das substancias do interior.

E' digno de salientar, na citolojia deste tripanozómida, a estrutura do blefaroplasto. Este se aprezenta com todas as partes e com a organização identica á do nucleo, com cariozoma, zona do suco nuclear, correspondendo ao halo claro que circumda este e membrana nuclear, de contorno nem sempre muito nitido. O modo de encarar o assunto pela escola de SCHAUDINN, por V. PROWAZEK, HARTMANN, etc., que consideram o blefaroplasto como segundo nucleo, o nucleo locomotor dos tripanozomidas, tem aqui solido apoio.

Morfolojia e ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi no organismo da cobaia.

Foi no organismo da cobaia que estudámos, principalmente, o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, sendo nossa descrição bazeada em grande numero de experiencias com aquelle animal. Das fazes principais do ciclo evolutivo, principalmente daquellas que constituem, na evolução deste tripanozómida, fenomeno não conhecido nas outras especies, procurámos e obtivemos confirmação no organismo do *Callithrix penicillata*, do cão e de outros animais sensiveis.

No sangue periferico das cobaias inoculadas e sistematicamente estudadas o *Schizotrypanum cruzi* tem primeira faze de evolução no interior das hemátias e outra livre no plasma, conforme acima dissemos. Já nas formas intraglobulares a dualidade morfolojica é bem acentuada, aprezentando-se uma das einem Drittel der Breite des Plasmakörpers gleich kommt, zeigt eine geringe Zahl von Ausbuchtungen und lässt bei diesem Verfahren keine besondere Struktur erkennen. Die Geissel enspringt bei einigen Exemplaren von dem Basalkörperchen, das am Ende des Faserkegels liegt; manchmal ist jedoch weder die Centralspindel, noch das Basalkörperchen sichtbar und es entspringt dann die Geissel direkt der äusseren Membran des Blepharoplastkernes. Man kann annehmen, dass dann die Centralspindel rückgebildet und das Basalkorn infolge Schrumpfung unsichtbar geworden ist.

Das Plasma zeigt bei einigen Exemplaren eine sehr deutliche alveoläre Struktur, bei anderen jedoch einen undeutlichen diffusen, mehr oder weniger netzartigen Bau. Die Enden der Parasiten sind verschmälert und zugespitzt.

Die andere Form unterscheidet sich von der vorigen durch die viel geringere Grösse des Blepharoplasten und das Aussehen des Kernes. Hier zeigt der bald runde, bald eiförmige Blepharoplastkern ein kleineres Caryosom als in der vorigen Form, welches ebenfalls von einer helleren Zone umgeben ist, die in ihrer Peripherie einen Kreis von chromatischer Substanz in der Form einer Membran enthält. Vom Blepharoplastcaryosom entspringend, sieht man gewöhnlich die Centralspindel mit dem Basalkörperchen an einem Ende.

Der Kern ist rund, mit einem kleineren zentralen Caryosoma als in der vorigen Form, einer hellen Kernsaftzone ohne chromatische Substanz und dicker Membran. Bei dieser Form beobachtet man häufig einen sonderbaren Zustand des Kernes. Aehnliches wurde (nach mündlichen Mitteilungen von Dr. HARTMANN) von JOLLOS bei *Coccidien* und von ZÜLZER bei *Heliozoen* beobachtet (Fig. 1, 5, 6 u. 7, Taf. 13).

Die Kerne zeigen sich oft im Zustande der Mitose, ohne dass man an den anderen Teilen des Zellorganismus Teilungen erblicken könnte. Es handelt sich um eine frühzeitige Mitose des Kernes, welche einer Schizogonie des Parasiten vorangeht, eine heutzutage in der Cytologie der Protozoen bekannte Er-

formas, nos preparados tratados pelo GIEMSA, com grande blefaroplasto colocado na extremidade posterior e com nucleo muito longo, lonjitudinalmente disposto (Est. 10, fig. 11 e 12). A outra forma caracteriza-se pelo blefaroplasto menor, pelo aspeto do nucleo que, ao em vez de ser longo e estar lonjitudinalmente disposto, aprezenta-se ovoide, com a cromatina menos condensada, e, finalmente pela largura maior do plasma. Numa e noutra fórma o blefaroplasto, que, nos organismos completamente dezenvolvidos se acha quazi na extremidade posterior, póde ser visto afastado desta, mais para as proximidades do nucleo.

Em algumas fórmas intra-globulares não existem ainda o flajelo e a membrana ondulante, tambem auzentes, ás vezes, das formas prezas ás hemátias pelo blefaroplasto (Est. 10, fig. 17 e 18). Nestas ultimas, muito frequentes conforme dissemos, não é raro ver-se o nucleo localizado em porção dilatada do parazito, que se aprezenta com aspeto piriforme (Est. 10, fig. 16 e 17). E' frequente nas hemátias a que se acham prezos tripanozomidas ver-se a impressão deixada no globulo pelo parazito, parecendo nem sempre haver destruição do globulo vermelho parazitado. Não vimos, jamais, qualquer aspeto de pigmentação das hemátias em que se achavam tripanozomidas incluidos.

Abundantes no inicio da infeção, as fórmas intra-globulares do parazito são vistas em qualquer periodo, em maior ou menor quantidade, o que não admira, visto serem ellas faze necessaria na evolução deste flagelado.

Os tripanozomidas livres no plasma aprezentam morfolojia semelhante á das fórmas intra-globulares. E minuciozamente tratámos dessa morfolojia, quando descrevemos o parazito do sangue do sagui inoculado com sangue humano, pelo que, quazi nada nos resta dizer.

A dualidade de fórma continúa evidente. E, admitindo diferenciação sexuada relativa á diversidade morfolojica, deveremos considerar femea a fórma com blefaroplasto menor, quazi sempre esferico, com nucleo ovoide de cromatina frouxa, nas colorações pelo GIEMSA, scheinung. Verschiedene unserer Zeichnungen geben diesen Vorgang wieder und auf einer derselben (Fig. 1, Taf. 13) sieht man deutlich die Teilung des Centriols mit Bildung der Centralspindel (Centrodesmose); die beiden Hälften des Nucleus sind ungleich, was nicht, wie es auf den ersten Blick scheinen könnte, eine heteropolare Teilung beweist, sondern, wie das nach JOLLOS auch bei der Coccidie *Adelea ovata* in der Regel der Fall ist, eher eine Ungleichheit in der Entwicklung der beiden Teile des Kernes andeutet. Es bleibt in dieser Figur die Kernmembran noch unverändert, obgleich die Substanzen im Innern schon fast vollständig geteilt sind.

Bei der Cytologie dieses Trypanosomas verdient die Struktur des Blepharoplasten hervorgehoben zu werden. Derselbe zeigt sich in allen seinen Teilen und in seiner Organisation als identisch mit dem Nucleus, indem er ein Caryosom, eine Kernsaftzone (der das erstere umgebende, helle Hof) und eine Kernmembran mit — nicht immer sehr deutlichem — Umrisse besitzt. Hier findet die Anschauungsweise der SCHAUDINN'schen Schule (PROWAZEK, HARTMANN, u. s. w.), welche den Blepharoplasten als zweiten, lokomotorischen Kern der *Trypanosomen* ansieht, eine feste Stütze.

Morphologie und Entwicklungskreislauf des Schizotrypanum cruzi im Organismus der Meerschweinchen.

Den Entwicklungskreis des *Schizotrypanum cruzi* habe ich ganz besonders am Meerschweinchen studiert und meine Beschreibung beruht auf einer grossen Anzahl an diesen Tieren gemachter Versuche. Von den hauptsächlichsten Entwicklungsphasen dieses Trypanosomas, besonders denjenigen, welche noch unbekannte Vorgänge darstellen, suchte und fand ich die Bestätigung im Organismus der *Callithrix penicillata*, des Hundes und der anderen empfänglichen Tiere.

Im peripherischen Blute der geimpften und systematisch studierten Meerschweinchen hat das *Schizotrypanum cruzi* eine erste Entwicklungsphase im Innern der Blutkörperchen und eine zweite frei im Plasma, wie ich oben aus-

plasma mais largo. A outra fórma, de maior blefaroplasto, nucleo comprido e ovoide, plasma mais estreito, será, então, a fórma macha.

Não temos idéa formada, por emquanto, respeito á relação numerica entre essas duas fórmas no correr da infeção; certo é, porém, que em dados momentos ha predominancia evidente de uma sobre a outra.

Nas primeiras fazes de infeção observa-se no sangue periferico grande diversidade nas dimensões das fórmas de flajelados; encontram-se organismos, intra-globulares ou livres no plasma, muito estreitos e de pequeno comprimento, com nucleo longo, em faixa, ou arredondado, indicando assim, desde este estádio joven, a dualidade morfolojica (Est 10, fig. 22, 23 e 24). Nos preparados, segundo ROSENBUSCH, encontrámos minucias de estrutura que merecem especial referencia. Os flajelados do plasma aprezentam blefaroplasto com a estrutura nuclear já descrita a propozito do tripanozomida humano no sangue; identica, tambem, é a estrutura do nucleo, havendo ainda figuras muito tipicas de mitoze precoce. O aspeto do plasma, da membrana ondulante e do flajelo é identico aos descritos para o tripanozomida, no macaco. O que observámos aqui de interessante foi a prezença frequente de estrutura fibrilar especial, constituida de unica fibrila espessa (Centrodesmoze), ligando o nucleo ao blefaroplasto (Est. 13, fig. 5, 6 e 8). Parece tratar-se do fuzo central da divizão heteropolar, o qual teria permanecido, apoz as formações do blefaroplasto.

Esquizogonia do Schizotrypanum cruzi no pulmão de vertebrado.

As mais minuciozas pesquizas nunca nos permitiram verificar qualquer aspeto que pudesse ser considerado como divizão lonjitudinal do *Schizotrypanum cruzi* no sangue periferico, ou nos orgãos profundos. Este fato, de si, indicava a existencia de outro processo de multiplicação, que pesquizámos e verificámos amplamente, constando elle de esquizogonia do flagelado no pulmão dos animais infetados. Não temos ainda determinandergesetzt habe. Schon bei den intraglobulären Formen ist die morphologische Dualität gut gekennzeichnet, indem eine der Formen in Präparaten, die nach GIEMSA gemacht sind, einen grossen, am Hinterende liegenden, Blepharoplasten und einen sehr langen, längsgerichteten Kern zeigt (Fig. 11, 12, Taf. 10). Die andere Form charakterisiert sich durch kleineren Blepharoplasten und die Form des Kernes, welcher, statt lang und längsgerichtet, eiförmig und mit weniger dichtem Chromatin versehen erscheint, endlich durch die grössere Breite des Plasmakörpers. In beiden Formen kann der Blepharoplast, der in ganz entwickelten Organismen sich beinahe am Hinterende findet, von diesem entfernt und mehr in der Nähe des Kernes gesehen werden.

Bei einigen der intraglobulären Formen fehlt die Geissel und die undulierende Membran, welche auch zuweilen bei den Formen, die mittelst des Blepharoplasten an den Blutkörperchen haften, vermisst werden (Fig. 17 und 18, Taf. 10). Bei letzteren, die, wie gesagt, sehr häufig sind, sieht man öfters den Kern in einer erweiterten Portion der birnförmig erscheinenden Parasiten liegen (Fig. 16 und 17, Taf. 10). Nicht selten erkennt man in den Blutkörperchen, denen Trypanosomiden anhaften, den vom Parasiten zurückgelassenen Eindruck, wobei dasselbe nicht immer zerstört zu werden scheint. Niemals habe ich bei den eingeschlossenen Trypanosomiden irgend eine Andeutung von Blutpigment gesehen.

Die zu Anfang der Infektion häufigen, intraglobulären Parasitenformen werden zu jeder Zeit in grösserer oder geringerer Menge beobachtet, was nicht verwundern kann, da sie eine notwendige Entwicklungsphase dieses Flagellaten darstellen; die im Plasma frei vorkommenden Trypanosomiden zeigen eine Morphologie, welche derjenigen der intraglobulären Formen ähnlich ist. Dieselbe ist eingehend behandelt worden, als ich den Parasiten der mit menschlichem Blut geimpften Pinseläffchen beschrieb, weshalb nichts mehr darüber gesagt zu werden braucht. Die Dualität der Formen bleibt auch weiterhin deutlich. Wenn man entsprechend der verschiedenen Morphologie einen Geschlechtsunterschied an-

minismo seguro para surpreender a faze de esquizogonia do parazito, com facilidade. E' que a virulencia do *Schizotrypanum cruzi* parece variar de acordo com diversos fatores, ainda não determinados, parecendo delles o mais importante a passajem atravez do organismo da mesma especie animal. Assim é que, em nossas experiencias, a inoculação de 1 centimetro cubico de sangue de cobaias infetadas por conorrinos, matava, quazi seguramente, os animais, em 5 dias, aprezentando as cobaias grande abundancia de fórmas esquizogonicas no pulmão e alguns flajelados no sangue periferico. Apoz algumas passajens em cobaias, porém, o tripanozómida não matava mais os animais naquelle espaço de tempo, vindo as cobaias a morrer apoz 1 ou 2 mezes, geralmente com intensa infeção e sendo encontradas, no pulmão, grande abundancia de fórmas esquizogonicas. Por outro lado, em qualquer faze da molestia encontram-se poucas fórmas de multiplicação, sendo as vezes dificil verificar, nestas condições, a esquizogonia.

De multiplas experiencias concluimos ser o melhor processo, para obter abundancia de fórmas esquizogonicas, a inoculação intraperitoneal de 1 a 2 centimetros cubicos de sangue de cobaia infetada por conorrinos, sacrificando-se os animais, quando não morram, do 5.º ao 6.º dia depois da inoculação.

A abundancia de fórmas de esquizogonia no momento da morte dos animais com infeção demorada (cronica) e o menor numero dellas em outras fazes da molestia, nos animais sacrifacados, faz-nos acreditar em multiplicações periodicas do parazito, que seriam verdadeiras recrudecencias da molestia; tanto mais quanto, no sangue periferico, a quantidade de flajelados aprezenta ocilações, cujas normas não nos foi possivel ainda determinar.

No pulmão, a esquizogonia, como a do parazito da malaria, realiza-se nos capilares, multiplicando-se o tripanozómida do seguinte modo: Os parazitos perdem o flajelo e a membrana ondulante, deslocando-se o nucleo de sua pozição normal para o lado da extremidade anterior; esta extremidade, por movimento de flexão do organismo, aproxima-se

nimmt, müssen wir die Formen mit kleinerem, gewöhnlich rundem Blepharoplasten, mit eiförmigem, lockeres Chromatin enthaltendem Kerne und breiterem Plasmakörper (bei GIEMSA-färbung) als weibliche ansehen. Die andere Form mit grösserem Blepharoplasten, eiförmigem oder langgestrecktem Kerne und schmälerem Plasmakörper, wäre dann die männliche.

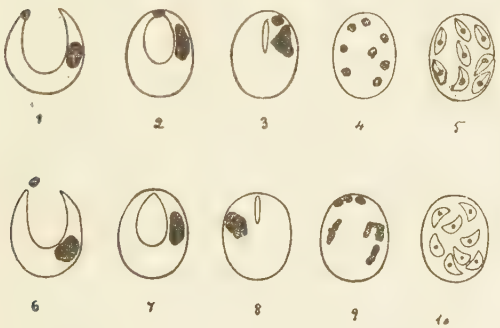
Ich habe zur Zeit noch kein sicheres Urteil über das Zahlenverhältnis, welches zwischen beiden Formen in Verlauf der Infektion besteht; jedoch steht soviel fest, das zu gewissen Zeiten die eine über die andere in auffallender Weise vorwiegt.

In den ersten Infektionsphasen beobachtet man im peripherischen Blute eine grosse Verschiedenheit in den Dimensionen der Flagellatenformen; man findet intraglobuläre und frei im Plasma vorkommende Organismen, die sehr schmal und kurz sind und einen breiten Kern haben, der bandförmig oder rund ist und die auf diese Weise schon im Jugendzustande die morphologische Dualität verraten. (Fig. 22, 23 und 24, Taf. 10). In den Präparaten nach ROSENBUSCH fand ich Struktureinzelheiten, welche eine besondere Erwähnung verdienen. Die Flagellaten im Plasma zeigen einen Blepharoplasten mit der — schon bei dem, vom Menschen abstammenden, Trypanosomiden des Pinseläffchens beschriebenen — Struktur; auch der Bau des Kernes ist identisch, indem gleichfalls typische Bilder von frühzeitiger Mitose vorkommen. Plasma, undulierende Membran und Geissel gleichen vollständig den bei den Parasiten des Aeffchens beschriebenen Bildern. Besonders interessant war auch eine, häufig beobachtete, fibrilläre Struktur, welche aus einer einzigen dicken, Kern und Blepharoplast verbindenden, Fibrille (Centrodesmose) besteht. (Fig. 5, 6, 8, Taf. 13). Es scheint sich um den Rest der Kernspindel der heteropolaren Teilung zu handeln, welche nach der Bildung des Blepharoplasten weiter besteht.

Schizogonie des Schizotrypanum cruzi in der Lunge der Wirbeltiere.

Die eingehendsten Beobachtungen gestatteten mir niemals, im peripherischen Blute

da posterior com ella se fundindo; torna-se, então, esferico ou arredondado o parazito, e, é possivel ver ainda, em muitos exemplares, a fenda de separação entre as duas metades do organismo que se uniram lateralmente. O blefaroplasto tem, no fenomeno, duplo procedimento: Ora elle se separa do parazito, juntamente com o flajelo, antes que o tripanozómida se tenha tornado esferico, (Est. 10, fig. 31 a 36 e fig. do texto de 6 a 10) ora elle é conservado, funde-se com o nucleo e entra com elle em multiplicação. (Fig. do texto 1 a 5). Esta duplicidade de processo, em relação ao blefaroplasto, vem aliaz confirmada no aspeto das fórmas esquizogonicas completamente divididas. (Vide fig. 5 a 10 do texto).



Segue-se a divizão do nucleo; delle só, num dos casos; do nucleo e do blefaroplasto, no outro. O processo de divizão nuclear, os fenomenos celulares exatos deste momento do ciclo são ainda obscuros, porquanto não os estudámos, o que devemos fazer depois, com o emprego da fixação a humido e no estado vivo.

As fórmas segmentadas aprezentam 8 pequenos organismos claviformes, dispostos irregularmente no interior do espaço limitado por delgada pelicula que será, de certo, o periplasto do parazito. Esta pelicula, a um exame superficial, poderia impropriamente, fazer considerar as fórmas descritas como quistos, impressão fornecida, ainda, nos preparados fixados apoz dessecamento, por orla clara, de duplo contorno, que cerca o parazito nesta faze e que deverá ser explicada pela coagulação de substancias aderentes á

oder in den inneren Organen irgend ein Bild aufzufinden, welches als eine Längsteilung des Schizotrypanum angesehen werden könnte. Dies allein genügt, um die Existenz eines anderen Vermehrungsprozesses nahe zu legen; ich suchte einen solchen und fand ihn sehr reichlich: er besteht in einer Schizogonie des Trypanosomas in der Lunge der infizierten Tiere. Es fehlt noch an einem sicheren Anhaltspunkte, um die Schizogoniephase des Parasiten mit Leichtigkeit auffinden zu können. Der Grund liegt darin, dass die Virulenz des *Schizotrypanum cruzi* unter dem Einfluss verschiedener noch unbekannter Faktoren wechseln kann, wobei als der wichtigste die Passage durch den Organismus derselben Tierart erscheint. So tötete in unseren Versuchen die Einspritzung eines ccm. Blutes von Meerschweinchen, welche durch *Conorhinus* infiziert waren, die Tiere fast sicher in 5 Tagen, wobei die Meerschweinchen eine grosse Menge von Schizogonieformen in der Lunge und einige Flagellaten im peripherischen Blute zeigten. Nach einigen Meerschweinchenpassagen tötete aber das *Schizotrypanum* die Tiere nicht mehr in dieser Zeit, indem die Meerschweinchen ein bis zwei Monate später starben, gewöhnlich mit intensiver Infektion, wobei man in der Lunge eine grosse Menge von Schizogonieformen fand. Auf der anderen Seite finden sich in einer beliebigen Krankheitsphase nur wenige Vermehrungsformen, sodass es unter solchen Bedingungen schwer hält, die Schizogonie zu beobachten.

Aus zahlreichen Versuchen schliesse ich, dass die beste Methode, reichliche Schizogonieformen zu erhalten, in der Intraperitonealeinspritzung von 1 bis 2 ccm. Blut von Meerschweinchen, die durch *Conorhinus* infiziert wurden, besteht, wobei man die Tiere, wenn sie nicht sterben, am 5. oder 6. Tage nach der Einspritzung tötet.

Der Reichtum an Schizogonieformen bei Tieren mit chronischer Infektion im Momente des Todes und die geringere Zahl desselben bei — in anderen Phasen der Krankheit — getöteten — Tieren lässt mich an eine periodische Vermehrung des Parasiten glauben, wodurch eigentliche Rückfälle der Krankheit zu Stande

superficie da celula. Aliaz, aspeto identico é observado nas amebas em repouzo, especialmente nas culturas em agar, quer no estado vivo, quer no material fixado.

Aprezentam-se com dois aspetos, em relação á estrutura dos merozoitos, as fórmas segmentadas do parazito, bem estudadas nos preparados fixados pelo metodo de SCHAUDINN e córados pelo de ROSENBUSCH. Verificámos, assim, duas estruturas bem distintas: óra, os merozoitos se aprezentam com nucleo esferico, tendo pequeno cariozoma central e zona de suco nuclear distinta limitada por delgada membrana, (Est. 13, Fig. 26) não sendo encontrado nestes o blefaroplasto; óra se aprezentam com nucleo, possuindo maior quantidade de cromatina, tendo cariozoma maior que o das fórmas anteriores, esferico e unico, ou disposto em 2 lóbos; nestes vê-se quazi sempre o blefaroplasto, colocado na extremidade delgada do parazito e ligado ao nucleo por filamento cromatico (Est. 13, Fig. 25, 27 e 28) ou situado muito proximo do nucleo, delle apenas diferenciado. Na mesma fórma segmentada encontram-se, ás vezes, diversos estádios dos merozoitos em relação á pozição do blefaroplasto, conforme é facil verificar á fig. 27, Est. 13. Os merozoitos da primeira estrutura, que consideramos como fórmas femeas, são tambem menores que os outros, que acreditamos ser os elementos machos. E' bem de crer que as fórmas segmentadas, cujas unidades se aprezentam já com o blefaroplasto, individualizado, correspondam aos tripanozómidas que conservaram o blefaroplasto, e as outras sejam a esquizogonia dos flajelados cujo blefaroplasto fôra expelido com o flajelo, no momento de se tornarem esfericos, no pulmão. Nos preparados córados pelo GIEMSA é possivel verificar alguns pontos da estrutura descrita, especialmente a prezença ou auzencia do blefaroplasto. (Est. 11, Fig. 42, 43, 44 e 46). Alí, porém, o nucleo se aprezenta sem estrutura apreciavel, como massa de cromatina compacta, geralmente disposta em 2 lóbos. (Est. 11, Fig. 45).

Os merozoitos, parece, escapam individualmente do espaço limitado pela pelicula envolvente; não ha aqui, como para o cazo do

kommen, um so mehr, als im peripherischen Blute die Zahl der Flagellaten Schwankungen zeigt, deren Gesetz ich noch nicht feststellen konnte.

In der Lunge vollzieht sich die Schizogonie, wie bei Malariaparasiten, in den Kapillaren, indem das Trypanosoma sich auf folgende Weise vermehrt: die Parasiten verlieren Geissel und undulierende Membran, während der Kern sich aus seiner normalen Stellung nach dem Vorderende zu disloziert; dieses Ende nähert sich durch eine Biegung des Organismus dem Hinterende und verschmilzt mit demselben; der Parasit wird so rundlich oder kugelförmig und man kann bei manchen Exemplaren noch die Trennungsspalte zwischen den beiden Hälften der Organismen, die sich seitlich vereinigt haben, wahrnehmen. Der Blepharoplast zeigt bei dieser Erscheinung ein zweifaches Verhalten: bald trennt er sich von dem Parasiten, zugleich mit der Geissel, bevor sich das Trypanosoma abrundet; bald bleibt er erhalten und vereinigt sich mit dem Kern, mit dem zusammen er die Vermehrung eingeht. Diese Duplizität des Prozesses in Hinsicht auf das Verhalten des Blepharoplastes wird durch das Aussehen der bereits völlig geteilten Schizogonieformen weiter bestätigt.

Es folgt hierauf die Teilung, in einem Falle des Kernes allein, im anderen des Kernes und Blepharoplasten. Der Prozess der Kernteilung und die genaueren Vorgänge in der Zelle während dieser Phase sind noch unklar, da ich sie nicht, wie ich später zu thun gedenke, unter Anwendung der feuchten Fixierung oder im lebenden Zustande studiert habe.

Die Teilungsformen zeigen 8 kleine, keulenförmige Teilungsprodukte, die unregelmässig im Innern eines, von dünner Haut begrenzten, Raumes angeordnet sind; letzerer muss dem Periplast des Parasiten entprechen und könnte bei oberflächlicher Untersuchung die beschriebenen Formen unrichtigerweise als Cysten auffassen lassen. Dieser Eindruck wird in den nach dem Trocknen fixierten Präparaten auch durch einen hellen Saum mit doppeltem Kontur, welcher den Parasiten in diesem Zustande umgiebt, hervorgerufen;

parazito da malaria, rutura total da fórma segmentada. E' o que se deduz de nossos dezenhos onde são vistos organismos atravessando a pelicula, ainda intata, e outros já no exterior, aderentes á superficie externa.

São estes os pequenos organismos, rezultantes da esquizogonia do tripanozómida no pulmão, que penetram nos glóbulos vermelhos e evolvem, chegando ao estádio de flajelados. As fórmas jovens intra-globulares aprezentam morfolojia identica á descrita nos merozoitos do pulmão; vêm-se organismos com o blefaroplasto já individualizado (Est. 10, Fig. 1) e outros sem blefaroplasto (Est. 10, Fig. 2 e 3); este se acha misturado ao nucleo. A formação do blefaroplasto nas fórmas intra-globulares da ultima categoria dá-se por divizão heteropolar do nucleo, conforme indica nosso dezenho. Aí se vê o blefaroplasto, já diferenciado, ligado ainda ao nucleo pelo fuzo central da divizão heteropolar. Devemos referir aqui a necessidade de preparados muito bem sucedidos para o estudo das fórmas jovens intra-globulares, as quais, por outro lado, só se encontram, em grande abundancia, em certas fazes da infeção, especialmente na faze inicial.

Evolução do Schizotrypanum cruzi no organismo do inséto transmissor.

A maioria de nossas experiencias sobre a evolução do *Schizotrypanum cruzi,* no organismo do *Conorhinus,* tem sido realizadas em larvas novas do hemiptero, nacidas no laboratorio. Os insétos adultos e as ninfas, quando colhidos em rezidencias de individuos na condição morbida referida, aprezentam, quazi em totalidade, flajelados no intestino médio e no reto, pelo que não constituem material de escolha para observações sistematicas sobre o ciclo exojeno do parazito.

Da condição infecioza de larvas, quando mantidas em suas sédes naturais, não temos conhecimento, por emquanto; aquellas, porém, nacidas no laboratorio, embóra de ovos postos por insétos que aprezentam flajelados no intestino, não se mostram infetadas. E, para a verificação necessaria da hipoteze de que os

doch ist derselbe aus der Gerinnung der Zellenoberfläche anhängender Substanzen zu erklären. Uebrigens beobachtet man ein gleiches Bild bei den ruhenden Amöben, besonders in Agarkulturen, an lebendem sowohl, wie an fixiertem Material.

Die segmentierten Formen des Parasiten zeigen in Hinsicht auf die Struktur der Merozoiten eine doppelte Form, welche — in nach SCHAUDINN fixierten und nach ROSENBUSCH gefärbten Präparaten — gut studiert wurden. Auf diese Weise fand ich zwei deutlich verschiedene Strukturen: einmal zeigen die Merozoiten einen runden Kern, welcher ein kleines Caryosom und eine deutliche, von dünner Membran begränzte, Kernsaftzone aufweist (Taf. 13, Fig. 26), wobei kein Blepharoplast gefunden wird; im anderen Falle haben sie einen Kern mit grösserer Chromatinmenge und einen Caryosom, welches grösser als bei den vorigen Formen, einheitlich oder aus zwei Lappen gebildet ist; hier sieht man fast immer den Blepharoplasten am dünnen Ende des Parasiten liegend und mit dem Kerne durch ein Chromatinfilament verbunden (Tafel 13, Fig. 25, 27 und 28) oder auch nahe am Kerne gelegen und kaum von demselben differenziert. In derselben Teilungsform findet man zuweilen, in Hinsicht auf die Lage der Blepharoplasten, verschiedene Formen der Merozoiten, wie man leicht in der Fig. 27, Taf. 13 erkennen kann. Die Merozoiten der zuerst beschriebenen Struktur, welche wir als weibliche Form auffassen, sind ausserdem kleiner als die anderen, die wir für männliche Elemente halten. Es ist auch anzunehmen, dass die Teilungsformen, deren Teilstücke sich im Blepharoplasten schon individualisiert zeigen, denjenigen Trypanosomen entsprechen, welche den Blepharoplasten beibehalten haben, während die anderen die Schizogonie des Flagellaten darstellen, welche — bei der Abrundung in der Lunge — den Blepharoplasten mit der Geissel abgestossen haben. Bei, nach GIEMSA gefärbten, Präparaten kann man einige Einzelheiten der beschriebenen Strukturen erkennen, besonders die Gegenwart oder das Fehlen des Blepharoplasten (Taf. 11, Fig. 42, 43, 44 und 46). Doch zeigt sich hier der Kern ohne erkennbare Struktur, als

flajelados das larvas em experiencia fossem parazitos naturais dellas, transmitidos por herança e cultivados no sangue injerido, procedemos, em muitas de nossas pesquizas, de modo a izentar os rezultados daquella cauza alegavel de erro. Assim é que dividiamos a coleção de larvas, nacidas dos ovos de determinada postura, em duas partes, alimentando uma dellas em animal infetado e a outra em animais indenes. A auzencia, multiplas vezes verificada, de flajelados no tubo dijestivo das larvas nutridas em animais normais, com a prezença simultanea de parazitos nas outras, elimina, de uma vez, a objeção possivel de infeção hereditaria do inséto e de cultura, nelle, de fórmas parazitarias preexistentes.

Algumas das fazes do ciclo evolutivo do flajelado foram verificadas em insétos adultos, nos quais, aliaz, repetimos muitas vezes as observações feitas nas larvas. Nas ninfas as pesquizas encontram maior dificuldade, porque nellas o sangue, na porção quilifica do intestino médio, sofre modificações rapidas, transformando-se desde o 3.º ao 4.º dia apoz a injestão, em massa extremamente compata e dura, na qual a fixação e coloração do parazito tornam-se quazi impossiveis.

O tubo dijestivo das larvas de *Conorhinus,* de 15 a 20 horas, apoz a primeira injestão de sangue, aprezenta, em relação ao conteúdo, duplo aspeto: Na porção quilifica do intestino médio, que se mostra dilatada ao extremo, ovoide, encontra-se sangue vermelho, em via de dijestão; na porção cilindrica, estreita, encontra-se liquido negro, granulozo, que reprezenta o rezultado da dijestão do sangue. Depois de 30 horas aparece no conteúdo liquido amarelado. A permanencia de sangue no intestino quilifico é longa, sendo elle aí encontrado até o 5.º dia depois da injestão.

Nos insétos adultos, recentemente alimentados, o aspeto do tubo dijestivo é identico, com pequenas variantes, ao das larvas; naquelles, porém, deixados em jejum desde alguns dias, 8 pelo menos, a porção quilifica não aprezenta sangue, contendo só um liquido incolor espumozo.

eine kompakte, gewöhnlich zweilappige Chromatinmasse (Taf. 11, Fig. 45).

Wie es scheint, schlüpfen die Merozoiten einzeln aus dem von der umgebenden Membran begrenzten Raume aus, indem es hier nicht, wie im Falle der Malariaparasiten, zu einem gänzlichen Zerfall der Teilungsform kommt. Dies kann man aus unseren Zeichnungen ersehen, wo man Organismen erkennt, welche die noch erhaltene Membran durchsetzen und andere schon freiliegende, welche der äusseren Fläche anhaften.

Diese kleinen aus der Schizogonie in der Lunge hervorgehenden Organismen sind es, welche in die roten Blutkörperchen eindringen und sich zur Phase von Flagellaten entwickeln. Die jungen endoglobulären Formen zeigen eine identische Morphologie, wie die beschriebenen Merozoiten der Lunge, indem man Organismen mit schon individualisierten Blepharoplasten sieht, wobei derselbe noch mit dem Kern vereinigt ist (Tafel 10, Fig. 1), neben anderen ohne solchen (Taf. 10, Fig. 2 und 3).

Die Bildung des Blepharoplasten in der letzten Art von intraglobulären Formen erfolgt durch heteropolare Kernteilung, wie unsere Zeichnung zeigt. Hier sieht man den Blepharoplasten schon differenziert, aber noch mit dem Kerne durch die Centralspindel der heteropolaren Teilung verbunden. Ich muss hier die Notwendigkeit gut gelungener Präparate für das Studium der jungen intraglobulären Formen betonen; letztere finden sich überdies nur in gewissen Phasen, besonders zu Beginn der Infektion, in grosser Menge.

Entwicklung des «Schizotrypanum cruzi» im Organismus des Ueberträgers.

Die Mehrzahl meiner Versuche über die Entwicklung des *Schizotrypanum cruzi* im Organismus des *Conorhinus* stellte ich an jungen Larven dieser Wanze an, welche im Laboratorium ausgeschlüpft waren. Erwachsene Insekten und Nymphen, welche in den Wohnungen von Patienten mit den bereits geschilderten Krankheitserscheinungen gesammelt wurden, zeigten fast durchwegs Flagellaten im Mittel- und Enddarm, weshalb sie

Nas ninfas, desde o 5.º dia, o sangue, na porção quilifica do tubo dijestivo, transforma-se em massa compata, onde as pesquizas são dificeis.

As larvas só aceitam refeição 4 ou 5 dias apoz a eclozão. D'aí em diante, embóra com permanencia de sangue no intestino quilifico, sugam facilmente de 3 em 3 dias, repletando-se a cada refeição, ficando então com o abdome muito aumentado, de fórma ovoide.

De numerozas experiencias, realizadas sobre a evolução do *Schizotrypanum cruzi* no organismo do *Conorhinus,* temos colhido rezultados do mais alto interesse, quer para a biolojia particular daquelle flajelado, quer para o ponto de vista geral, para as questões de doutrina relativas ao mecanismo da transmissão dos hemoflajelados pelos invertebrados. Existem ainda, é certo, nesta parte de nosso trabalho, alguns pontos importantes não esclarecidos e cuja solução nos preocupa atualmente; do que ha feito, porém, será talvez possivel tirar ilações aproveitaveis ás pesquizas similares, achando-se, em nossos rezultados, esclarecidos muitos fenomenos, até aqui obscuros, do papel dos hospedeiros intermediarios nas tripanozomiazes.

Exporemos primeiro, simplesmente, nossas observações, estudando as transformações morfolojicas do parazito nas diversas fazes do ciclo; em considerações finais procuraremos então interpretar os fatos adquiridos, concluindo de acordo com as experiencias realizadas.

Decorridas 6 horas apoz a injestão, pelo *Conorhinus,* de sangue contaminado, têm lugar as primeiras modificações evolutivas do parazito.

O blefaroplasto, que nos organismos normais se acha muito proximo ou exatamente na extremidade posterior da celula, caminha dalí para as proximidades do nucleo, pondo-se em contato intimo com elle (Est. 11, Fig. 47 a 55). Si ha fuzão do blefaroplasto com o nucleo principal, não o sabemos com segurança, sendo, porém, provavel que isso aconteça, porquanto, em muitas fórmas, neste momento o blefaroplasto é visto no interior do nucleo, constituindo aí um corpusculo mais intensamente córado.

kein geeignetes Material für systematische Beobachtungen über den exogenen Entwicklungszyklus des Parasiten bilden.

Ueber die Infektiosität von Larven an ihrem natürlichen Fundort habe ich zur Zeit keine Erfahrung; jedoch zeigten sich die im Laboratorium gezüchteten nicht infiziert, obwohl die Eier von Exemplaren stammten, welche Flagellaten im Darme zeigten.

Es erschien notwendig, die Hypothese zu prüfen, dass die Flagellaten der beim Versuche gebrauchten Larven natürliche Parasiten derselben seien, die erblich übertragen werden und sich nach der Blutaufnahme vermehren; ich ging daher bei vielen meiner Untersuchungen so vor, dass ich die Möglichkeit dieser Fehlerquelle ausschloss. Ich teilte deshalb die, aus gleichzeitig abgelegten Eiern, ausgeschlüpften Larven in zwei Gruppen, von denen eine an einem infizierten Tiere, die andere an gesunden Tieren ernährt wurde. Die vielfach festgestellte Abwesenheit der Flagellaten im Darme der mit dem Blute normaler Tiere ernährten Larven und das gleichzeitige Vorkommen der Parasiten bei den andern schliesst vollständig den Einwand aus, dass eine hereditäre Infektion des Insektes und eine in demselben erfolgte Vermehrung präexistierter Parasiten vorliege.

Einige Phasen des Entwicklungszyklus der Flagellaten wurden bei erwachsenen Insekten festgestellt, bei welchen wir übrigens die an den Larven gemachten Beobachtungen oftmals wiederholten. Bei den Nymphen stossen die Untersuchungen auf grössere Schwierigkeiten, da bei denselben das Blut in dem chylusbildenden Teile des Mitteldarmes sich rasch verändert und vom dritten oder vierten Tage an eine äusserst kompakte und harte Masse darstellt, welche die Fixierung und Färbung des Parasiten fast unmöglich macht.

Der Darmkanal der *Conorhinuslarven* zeigt 15—20 Stunden nach der ersten Blutaufnahme eine zweifache Beschaffenheit seines Inhalts: Im chylusbildenden Teile des Mitteldarmes, welcher extrem erweitert und eiförmig erscheint, findet man rotes Blut im Stadium der beginnenden Verdauung; im engeren cylindrischen Teile ist eine schwarze körnige Flüssig-

Nesta primeira faze a maioria das fórmas já se aprezenta sem flajelo e sem membrana ondulante, o que faz acreditar seja a perda destas duas estruturas o fenomeno inicial da evolução; alguns organismos, porém, com o blefaroplasto muito proximo do nucleo, possuem ainda flajelo, cuja porção livre tem, então, maior comprimento que nos parazitos normais. Os organismos, assim modificados, tornam-se depois redondos (Est. 11, Fig. 58) e entram em multiplicação, ás vezes muita rapida, vendo-se grandes aglomerações de fórmas esfericas. Cumpre salientar que estas fórmas aparecem frequentemente sem blefaroplasto e que tambem se encontram figuras que denunciam nova formação do blefaroplasto achando-se elle ainda ligado ao nucleo principal pelo filamento central da divizão hetero-polar, e, finalmente, fórmas ha sem esta ligação entre os dois nucleos.

Estas fórmas são a principio aflajeladas e, nos preparados fixados humidos e córados pelo ROSENBUSCH, mostram a estrutura seguinte:

O plasma é alveolar, de colorido uniforme e aprezenta, na superficie, delgada camada mais condensada, que é o periplasto. O nucleo, de fórma esferica, colocado no centro da celula, mostra um grande cariozoma, em cujo centro, nos preparados mais diferenciados, é possivel, ás vezes nitidamente, verificar a prezença do centriolo (Est. 13, Fig. 9).

Em torno do cariozoma existe largo espaço claro, a zona de suco nuclear, atravessada, no sentido transversal, por finas trabeculas de linina, limitada por membrana de contornos muito regulares. Esta membrana, óra se aprezenta com aspeto homojeneo, óra mostra pequenos granulos de cromatina mais intensamente córados (Est. 13, Fig. 13) regularmente dispostos e equidistantes. A estes granulos prendem-se os filamentos de linina partidos do cariozoma.

O nucleo, assim descrito para a generalidade das fórmas observadas, aprezenta algumas variantes, relativas, sobretudo, á quantidade da substancia cromatica contida na zona do suco nuclear, onde, ás vezes, a cromatina

keit enthalten, welche das Endresultat der Blutverdauung darstellt. Nach 30 Stunden erscheinen im Rektum die Exkremente in Form einer gelblichen Flüssigkeit. Das Blut verweilt im Chylusdarm eine lange Zeit und wird daselbst noch 5 Tage nach der Aufnahme gefunden.

Bei erwachsenen, frisch gefütterten Insekten gleicht der Darmkanal demjenigen der Larven bis auf geringe Unterschiede; dagegen zeigen sie nach längerem, wenigstens 8-tägigem, Fasten im Chylusdarme nicht Blut, sondern eine farblose schaumige Flüssigkeit.

Bei den Nymphen verändert sich das Blut im Chylusdarme, wie gesagt, vom 5. Tage an in eine kompakte Masse.

Die Larven nehmen die Nahrung erst 5 bis 6 Tage nach dem Ausschlüpfen an. Von da an und trotz des Fortbestehens vom Blut im Chylusdarme, saugen sie ohne Umstände von 3 zu 3 Tagen, indem sie ihn jedes mal vollständig anfüllen, sodass der Hinterleib sehr vergrössert und eiförmig erscheint.

Aus den vielfachen Versuchen über die Entwicklung des *Schizotrypanum cruzi* in *Conorhinus* gewann ich höchst interessante Resultate, sowohl in Hinsicht auf die specielle Biologie dieser Flagellaten, als auch in Beziehung auf die allgemeine Lehre über den Vorgang der Uebertragung der Hämoflagellaten durch blutsaugende Schmarotzer. Allerdings gibt es in diesem Teile meiner Untersuchung einige Punkte, die noch unaufgeklärt sind und mich gegenwärtig beschäftigen; doch kann man wohl aus dem bereits Festgestellten Schlüsse ziehen, welche für ähnliche Untersuchungen von Nutzen sind, da sich hier die Erklärung vieler bisher dunkler Erscheinungen in Beziehung auf die Rolle des Zwischenwirtes bei Trypanosomenerkrankungen findet.

Ich gebe zuerst nur meine Beobachtungen wieder, aus welchen die morphologischen Veränderungen des Parasiten in den verschiedenen Entwicklungsstadien ersichtlich sind; hierauf werde ich die Tatsachen zu erklären und aus den zahlreichen Experimenten endgiltige Schlüsse zu ziehen suchen.

Sechs Stunden nach der Aufnahme des parasitenhaltigen Blutes durch den *Conorhinus* gehen die ersten Veränderungen des Para-

é mais abundante, constituindo, em algumas fórmas, fina rêde na superficie interna da membrana nuclear. São variações que, na teoria de HARTMANN, devem ser atribuidas ás modificações ciclicas do cariozoma (lançamento de cromatina na zona de suco nuclear) e que são comparaveis a fenomenos similares observaveis na *Amoeba tetragena*.

O blefaroplasto aprezenta aqui aspeto comparavel ao descrito nos flajelados do sangue. Nelle existe um grande cariozoma, quazi sempre constituido por espessa barra de substancia cromatica, (Est. 13, Fig. 9 e 11) curva, aprezentando concavidade voltada, — nas fórmas jovens aflajeladas — para o lado do nucleo. Cérca o cariozoma do blefaroplasto zona clara, na qual não são viziveis filamentos cromaticos; é a zona do suco nucleo-blefaroplastico limitada por delgada membrana de contornos pouco regulares.

A pozição do blefaroplasto é, como já dissémos, variavel, achando-se, óra colocado no interior do nucleo, em qualquer ponto da zona do suco nuclear, óra aderente á superficie externa da membrana delle, óra, finalmente, distante do nucleo, a este ligado, ás vezes, pelo filamento central da divizão hetero-polar.

Nos preparados córados pelo GIEMSA, nesta como nas fazes seguintes da evolução exojena do flajelado, encontram-se granulações córadas em vermelho intenso, de dimensões variaveis. São identicas ás descritas por ROSENBUSCH nas culturas de hemoproteo e parecem ser granulações de volutina (SWELLENGREBEL).

A formação do aparelho flajelar inicia-se, muitas vezes, nestas fórmas esfericas, encontrando-se então, (Est. 13, Fig. 9, 11 e 12) como rezultado da divizão heteropolar do blefaroplasto, um cone de fibrilas, o *fuzo central com o rizoplasto do centro,* que aprezenta no apice um granulo de substancia cromatica, o *corpusculo bazal,* orijem do flajelo. Algumas vezes, nas fórmas esfericas, o flajelo só tem porção intra-celular, não existindo ainda, aí, flajelo livre; em alguns organismos, porém, já se encontra flajelo livre, que, frequentemente atinje grande comprimento.

siten vor sich. Der Blepharoplast, welcher beim normalen Organismus sich sehr nahe oder ganz am Hinterende der Zelle befindet, wandert von dort in die Nähe des Nucleus und tritt mit demselben in innige Berührung. (Taf. 11, Fig. 47 und 55). Ob eine Verschmelzung des Blepharoplasten mit dem Hauptkerne stattfindet, weiss ich zwar nicht gewiss, doch ist es wahrscheinlich, da man bei vielen Formen zu dieser Zeit den Geisselkern im Innern des Nucleus sieht und zwar in Gestalt eines stärker gefärbten Körnchens.

In diesem ersten Stadium zeigt sich die Mehrzahl der Formen bereits ohne Geissel und undulierende Membran, sodass man den Verlust dieser beiden Strukturen als die erste Erscheinung der Entwicklung auffassen kann; doch besitzen einige Formen, deren Blepharoplast dem Kerne sehr genähert ist, noch eine Geissel, deren freier Teil dann länger erscheint, als bei der normalen Parasitenform. Nach dieser Veränderung rundet sich der Organismus ab (Taf. 11, Fig. 58) und vermehrt sich, oft sehr schnell, durch Teilung, sodass man grosse Haufen von runden Formen sieht. Es verdient hervorgehoben zu werden, dass diese Formen häufig keinen gesonderten Blepharoplast zeigen und dass man Bilder trifft, die auf eine Neuentstehung des Blepharoplasten hinweisen. So findet er sich bald im Innern des Kernes, an einem beliebigen Punkte der Kernsaftzone, bald an der Aussenfläche — der Membran anliegend oder vom Nucleus entfernt, aber mit diesem manchmal durch die Centralfaser der heteropolaren Teilung verbunden —; schliesslich kann auch eine solche Verbindung fehlen. Diese Formen sind anfangs geissellos und zeigen in feuchtfixierten und nach ROSENBUSCH gefärbten Präparaten folgende Struktur: das Plasma erscheint alveolär und zeigt in der Oberfläche eine schmale Zone stärkerer Verdichtung, welche den Periplast darstellt. Der runde, im Zentrum der Zelle gelagerte, Kern zeigt ein grosses Caryosom, in dessem Zentrum man bei gut differenzierten Präparaten oft ganz deutlich ein Centriol (Taf. 13, Fig. 9) wahrnimmt. Das Caryosom ist von einem breiten hellen Hofe, der Kernsaftzone umgeben, welche

Sobre o flajelo, geralmente na extremidade delle, é visto muitas vezes um segundo granulo cromatico, menor que o corpusculo bazal, de colorido semelhante ao daquelle. A prezença de tal corpusculo se liga ao mecanismo de formação do flajelo, reprezentando elle, de acôrdo com a teoria de SCHAUDINN, o centriolo da segunda divizão hetero-polar.

Este fato foi tambem verificado por HARTMANN nos microgámetas do proteozoma e por ROSENBUSCH em diversos tripanozómidas.

Em continuação ás fórmas precedentes encontram-se no intestino quilifico organismos mais dezenvolvidos, alguns piriformes, com extremidade afilada, pela qual emerje o flajelo, e o lado oposto mais ou menos rombo, ás vezes regularmente arredondado (Est. 13, Fig. 12, 21 e 22). Nestas fórmas, óra existe flajelo livre, óra só é encontrada a porção intracelular do flajelo; nellas a estrutura é semelhante á descrita para os organismos esfericos sendo, porém, mais acentuadas algumas das minucias estruturais que referimos. Assim é que na membrana do nucleo frequentemente são vistos os granulos cromaticos, o mais das vezes em numero de 8 (Est. 13, Fig. 21) e o blefaroplasto aprezenta estrutura nuclear mais bem caraterizada (Est. 13, Fig. 12 e 21). Nesta faze é comum observar o fenomeno de divizão prévia do nucleo, referido nos flajelados do sangue, sendo demonstrativo deste fato um dos nossos dezenhos (Est. 13, Fig. 22) no qual o cariozoma do nucleo principal mostra dois centriolos, o mesmo acontecendo ao cariozoma do nucleo-blefaroplasto. Neste os dois centriolos se acham ligados por filamento central, que é formado pela divizão do centriolo.

A pozição do blefaroplasto é aqui variavel, sendo elle encontrado quazi sempre atraz do nucleo, afastado da extremidade ponte aguda (Est. 13, Fig. 21 e 22) podendo tambem ser visto ao lado do nucleo principal.

Simultaneamente com os ultimos organismos vêm-se outros menores, geralmente aflajelados (Est. 11, Fig. 58—59) ou só aprezentando a baze do aparelho flajelar, de fórma ovoide, com a estrutura do nucleo e a do

von feinen Linienbälkchen durchsetzt und von einer regelmässig begrenzten Membran umschlossen ist. Diese Membran erscheint bald homogen, bald zeigt sie kleine Chromatin-Granula, die stärker gefärbt und regelmässig, in gleichen Abständen angeordnet sind. (Taf. 13, Fig. 13). An diese Körnchen schliessen sich die Lininfäden, welche vom Caryosom ausgehen.

Der Kern, den ich so beschrieben habe, wie er in der Regel bei den beobachteten Formen auftritt, zeigt oft eine Abänderung; dieselbe bezieht sich hauptsächlich auf die Menge der chromatischen Substanz, welche in der Kernsaftzone enthalten ist; hier tritt das Chromatin manchmal reichlicher auf, sodass es bei einigen Formen an der Innenfläche der Kernmembran ein feines Netzwerk bildet. Es sind dies Bilder, welche (nach der Theorie von HARTMANN) auf zyklische Veränderungen des Caryosoms zurückzuführen sind (Abgabe von Chromatin in die Kernsaftzone) und sich mit ähnlichen Erscheinungen bei der *Amoeba tetragena* vergleichen lassen. Ber Blepharoplast zeigt hier Aehnlichkeit mit dem Bilde, welches von Blutflagellaten beschrieben wurde; er enthält ein grosses Caryosom, welches fast immer von einem dicken und gekrümmten Chromatinbalken gebildet ist (Taf. 13, Fig. 9 und 14), welcher bei jungen geissellosen Formen mit der Konkavität dem Kerne zugewandt ist. Das Caryosom des Blepharoplasten ist von einer hellen Zone umgeben, in welcher weder Chromatin noch Linin sichtbar sind. Es ist dies seine Kernsaftzone, welche durch eine feine, nicht sehr regelmässig konturierte, Membran begrenzt wird.

In dieser und den darauffolgenden Phasen des exogenen Entwicklungszyklus des Flagellaten finden sich, in nach GIEMSA gefärbten Präparaten, intensiv rot gefärbte Granulationen von wechselnder Grösse im Innern des Plasma. Sie entsprechen den von ROSENBUSCH in den Kulturen von *Hämoproteus* beschriebenen und scheinen aus Volutin (SWELLENGREBEL) zu bestehen.

Die Bildung des Geisselapparates beginnt häufig bei diesen runden Formen; man findet dann (Taf. 13, Fig. 9, 11 und 12) als Resultat der heteropolaren Teilung des Blepharoplas-

blefaroplasto identicas á referida. Destas fórmas encontram-se frequentemente aglomerações consideraveis, o que indica, nellas, ativa multiplicação.

Divizão dos flajelados no intestino quilifico.

Em qualquer das fórmas descritas do parazito, a multiplicação, por cizão lonjitudinal, na primeira parte do intestino médio, é muito ativa, sendo encontrados organismos com nucleos e blefaroplastos multiplos, óra com 2 blefaroplastos e 1 só nucleo principal, fato o mais frequente; óra, ao contrario, com 2 nucleos principais e 1 só blefaroplasto; óra, finalmente, com igualdade das duas especies de nucleos. Tambem se observam estadios varios da divizão celular, sendo frequente, nas grandes aglomerações de fórmas esfericas ou ovoides, acharem-se os parazitos ligados entre si por meio de delgadas laminas de plasma. Variantes multiplas de aspeto são ainda vistas, relativas ao nucleo principal e ao blefaroplasto, á prezença ou auzencia de flajelos. Assim é que frequentes vezes vêm-se fórmas com um só nucleo principal e 2 blefaroplastos, cada um destes possuindo um aparelho flajelar. Parece, da maioria de aspetos observados, ser a divizão do nucleo principal quazi sempre precedida pela do blefaroplasto; aliaz nas figuras de mitoze que surpreendémos, o mais das vezes a mitoze do blefaroplasto se acha em faze mais adiantada que a do nucleo principal.

Os preparados fixados secos e córados pelo GIEMSA, nada ensinam dos fenomenos intimos dos 2 nucleos, pelo que, nossas pesquizas sobre este ponto foram feitas com o metodo de ROSENBUSCH. Não nos foi possivel, por emquanto, surpreender todas as fazes da divizão dos nucleos principal e locomotor; procedemos atualmente a novos estudos, cujos rezultados serão referidos mais tarde. Alguns estadios que observámos da mitoze do nucleo principal e do blefaroplasto são muito interessantes, merecendo expozição minucioza. As Figs. 83—86 da Est. 13 reprezentam fazes terminais de mitoze. Nestas mesmas figuras observam-se as telofazes

ten, einen Faserkegel, die Centralspindel, welche den Rhizoplasten umgiebt; erstere zeigt an ihrer Spitze ein Chromatinkorn, das Basalkörperchen, von welchem die Geissel entspringt.

Manchmal haben diese runden Formen keine freie Geissel, sondern nur den intracellulären Teil derselben; doch findet sich bei einem Teil der Organismen eine freie Geissel, die nicht selten eine bedeutende Länge erreicht.

An dieser Geissel, gewöhnlich an ihrem Ende, sieht man häufig ein zweites Chromatinkorn, welches kleiner ist, als das Basalkörperchen, demselben aber in der Färbung gleicht.

Das Vorkommen eines solchen Körperchens entspricht der Bildungsweise der Geissel, indem es nach der Theorie von SCHAUDINN das Centriol einer zweiten heteropolaren Teilung darstellt. Diese Auffassung ist ja auch von HARTMANN für die Mikrogameten von *Proteosoma* und von ROSENBUSCH für verschiedene Trypanosomiden begründet worden.

Einer weiteren Entwicklung der beschriebenen Form entsprechend, findet man im Chylusdarme Organismen, die zum Teil birnförmig sind; vom zugespitzten Ende entspringt die Geissel, während das andere mehr oder weniger stumpf und nicht selten regelmässig gerundet erscheint (Tafel 13, Fig. 12, 21 u. 22). Bei diesen Formen findet sich bald eine freie Geissel, bald nur der intracelluläre Teil einer solchen; ihre Struktur gleicht derjenigen der sphärischen Organismen, doch sind einige der beschriebenen Strukturdetails deutlicher ausgeprägt; so sieht man in der Kernmembran häufig Chromatingranula, gewöhnlich deren acht, (Taf. 13, Fig. 21), und der Blepharoplast zeigt eine deutlichere Kernstruktur (Taf. 13, Fig. 12, u. 21). In dieser Phase beobachtet man häufig die, schon von den Blutflagellaten bekannte, vorläufige Kernteilung, wie dies eine meiner Zeichnungen (Tafel 13, Fig. 22) darstellt, in welcher das Caryosom des Hauptkernes zwei Centriolen zeigt, wie es auch bei den Caryosom des Blepharoplastkernes der Fall ist. Bei diesem finden sich die Centriolen an beiden Enden verbunden durch die Fibrille der Centralfaser, welche durch Teilung des Centriols selbst gebildet wird.

Auch hier ist die Lage des Blepharoplasten

de divizão do blefaroplasto e do nucleo principal. No blefaroplasto, ligando as duas metades da figura, permanece o filamento central do fuzo, cujas extremidades prendem-se aos dois centriolos colocados nos centros dos cariozomas. Num destes ha divizão precoce do centriolo, destinada, talvez, á formação do aparelho flajelar ou á nova mitoze do blefaroplasto. A mitoze do nucleo principal se acha em estadio mais atrazado, vendo-se as duas metades da figura ligadas ainda pelo fuzo central da divizão *(Centralspindel)* em cujo centro existe o filamento central *(Centralfaser),* que tem nas extremidades os dois centriolos. Os novos cariozomas já se acham organizados, e tambem as zonas de suco nuclear, com as membranas envolventes. Fatos similares vêm demonstrados á Fig. 10 da Est. 13. A Fig. 83 da Est. 13 reprezenta a faze terminal da mitoze do nucleo principal, achando-se os 2 nucleos filhos ligados pelo *Centralspindel* (fuzo central e filamento). As substancias dos dois cariozomas aprezentam-se aí dispostas em dois cones, a cujos apices se acham prezas as extremidades do fuzo. Nas Figs. 84 e 85 da Est. 13 vêm-se ainda fazes terminais de mitozes, sendo de notar aí a divizão do centriolo de alguns blefaroplastos.

Estas observações são relativas ás fórmas esfericas aflajeladas, ficando para mais tarde a referencia de fenomenos similares que temos observado em fórmas flajeladas, quer nas fórmas novas, quer em organismos critidiais completamente dezenvolvidas.

Devemos salientar aqui a evidencia do papel do centriolo nas mitozes do nucleo principal e do blefaroplasto, atuando elle, cuja divizão precede sempre á das outras partes do nucleo, como o orgão orientador do fenomeno. E' esta nova demonstração, bem clara, da teoria de v. PROWAZEK e HARTMANN, para quem o centriolo do cariozoma reprezenta, na mitoze dos protozoarios, função identica á do centriolo do centrozomio nas celulas dos metazoarios. Aliaz, observações multiplas sobre fenomenos de divizão nuclear, em outros grupos de protozoarios, fazem-nos absolutamente convencido das idéas daquelles inves-

eine wechselnde; gewöhnlich findet man ihn hinter dem Nucleus, entfernt vom zugespitztem Ende (Taf. 13, Fig. 21 u. 22); doch kann er auch neben dem Hauptkerne getroffen werden.

Gleichzeitig mit den letztbeschriebenen Formen findet man andere kleinere und gewöhnlich geisellose (Taf. 13, Fig. 58-59) oder nur die Basis derselben zeigende, von ovaler Form und mit, wie oben beschrieben, gebildetem Kerne und Blepharoplasten. Dieselben finden sich oft in beträchtlichen Gruppen, was eine rasche Vermehrung andeutet.

Teilung der Flagellaten im Chylusdarme.

Bei allen den oben beschriebenen Parasitenformen ist die Vermehrung durch Längsteilung im Anfangsteile des Mitteldarmes sehr lebhaft, wobei man Exemplare mit mehrfachen Blepharoplasten und Kernen findet; man trifft entweder 2 Blepharoplasten und einen Hauptkern, was am häufigsten vorkommt, oder im Gegenteil 2 Hauptkerne neben einem Blepharoplasten oder endlich beide Kernarten in der gleichen Zahl. Auch beobachtet man verschiedene Stadien der Zellteilung, wobei man in den grossen Haufen von runden und eiförmigen Formen nicht selten durch dünne Plasmenlamellen verbundene Parasiten antrifft. Auch finden sich verschiedene Kombinationen in Beziehung auf Hauptkern und Blepharoplast und das Fehlen oder Vorhandensein von Geisseln.

So findet man häufig Formen mit einem Hauptkern und 2 Blepharoplasten, von denen jeder einen Geisselapparat besitzt. Nach der Mehrzahl der Beobachtungen scheint die Teilung des Hauptkernes gewöhnlich derjenigen des Blepharoplasten zu folgen; übrigens findet sich auch bei den Teilungsphasen, die ich beobachtete, gewöhnlich die Mitose des Blepharoplasten weiter vorgerückt, als diejenige des Hauptkernes.

Trocken fixierte und nach GIEMSA gefärbte Präparate geben über die Einzelheiten der Kernteilung keinen Aufschluss, weshalb ich meine diesbezüglichen Untersuchungen nach ROSENBUSCH'scher Methode anstellte. Bis jetzt gelang es mir nicht, alle Phasen der Teilung

tigadores. Por outro lado, a mitoze do blefaroplasto, que neste parazito aprezenta aspeto de grande nitidez e regularidade, vem confirmar ainda a natureza nuclear daquelle orgão, cuja estrutura, na condição dinamica, quanto na estatica, é inteiramente comparavel á do nucleo principal.

Os nossos rezultados estão, por conseguinte, em pleno acordo com os novos achados de ROSENBUSCH sobre outros tripanozómidas e confirmam a interpretação sobre as condições do nucleo da celula dos tripanozómidas dada por SCHAUDINN e seus sucessores.

Flajelados da porção posterior ou intestiniforme do intestino médio do Conorhinus.

Ainda na porção quilifica do intestino médio, 25 horas apoz a injestão de sangue, encontram-se novas fórmas parazitarias que reprezentam estados evolutivos mais adiantados das fórmas descritas. Aí, porém, tais organismos são raros, parecendo que pouco tempo permanecem, apoz sua formação, neste segmento do tubo dijestivo, depressa passando para a porção cilindrica posterior, onde são vistos em grande numero.

Na porção intestiniforme do intestino médio, desde a 15.ª hora, encontra-se, como dissemos, liquido negro, que reprezenta faze mais adiantada da dijestão do sangue; os parazitos, porém, só aparecem neste liquido depois da 25.ª hora e aí, devido á rapida multiplicação, tornam-se numerozissimos, permanecendo indefinidamente vivos, embóra deixadas as larvas sem alimentação, infetante ou não, durante longos dias.

Estes flajelados são de morfolojia inteiramente identica á dos que existem no intestino de conorrinos adultos, colhidos nas zonas infetadas. Tambem nestes, privados de alimentação por muito tempo, os flajelados permanecem em plena atividade, mostrando mesmo fenomenos de multiplicação.

Os flajelados desta parte do intestino médio aprezentam grande variedade de aspetos, predominando, porém, os organismos critidiformes adultos Fig. 13—20, Est. 13. Estes

des Haupt- und lokomotorischen Kernes aufzufinden; doch bin ich mit weiteren Beobachtungen beschäftigt, über deren Resultate später berichtet werden soll. Einige Stadien der Mitose des Hauptkernes und Blepharoplasten, die ich beobachtete, sind sehr interessant und verdienen eine nähere Beschreibung. Die Fig. 83—86 der Taf. 12 zeigen die Endstadien der Mitose; in denselben Figuren sieht man die Telophasen der Teilung des Blepharoplasten und Hauptkernes. Die beiden Hälften der Figur verbindend, ist im Blepharoplasten die Centralfaser der Spindel erhalten und ihre Enden verbinden die beiden Centriolen, welche im Centrum der Caryosome liegen. Bei einem derselben bemerkt man eine vorzeitige Teilung des Centriols, die scheinbar für die Bildung des Geisselapparates oder eine neue Mitose des Blepharoplasten bestimmt ist. Die Mitose des Hauptkernes ist weniger vorgerückt, indem die Hälften der Teilungsfigur noch durch die Centralspindel und die, in der Mitte gelegene, Centralfaser mit den an beiden Enden gelegenen Centriolen verbunden sind. Die neuen Caryosomen, die Kernzonen und die umhüllenden Membranen sind bereits gebildet. Aehnliche Vorgänge erkennt man in der Fig. 10, Taf. 13. Die Fig. 13 der Taf. 12 zeigt das Ende der Mitose des Hauptkernes, wobei die beiden Tochterkerne durch Centralspindel und -Faser verbunden sind. Die Substanz der beiden Caryosomen erscheint hier in 2 Kegel angeordnet, an deren Spitzen sich die Enden der Spindel anlegen. In den Fig. 84 und 85 der Taf. 12 sieht man auch noch Endstadien der Mitose, wobei man die Teilung der Centriolen einiger Blepharoplaste erkennt.

Diese Beobachtungen beziehen sich auf die Mitose der runden, geissellosen Formen; auf eine spätere Zeit verschiebe ich den Bericht über ähnliche Erscheinungen, die ich an geisseltragenden Formen und zwar teils an jungen Stadien, teils an voll entwickelten Crithidienformen, beobachtet habe.

Ich muss hier die Rolle der Centriolen bei den Mitosen des Kernes und des Blepharoplasten hervorheben, welche sie unzweifelhaft als orientierende Organe des Teilungsphänomens spielen, indem ihre Teilung immer derjenigen

são parazitos alongados, de largura variavel, com ambas as extremidades ponteagudas, aprezentando, na coloração pelo metodo de ROSENBUSCH, plasma alveolar. A extremidade anterior prolonga-se em longo filamento delgado; a posterior, óra termina abruptamente em ponta aguda, óra se mostra arredondada, óra, finalmente, é tambem longa e aguda, menos delgada que a oposta.

O nucleo aprezenta estrutura semelhante á das fórmas anteriores: um cariozoma, em cujo centro é muitas vezes apreciavel centriolo, zona de suco nuclear, atravessada de finas e regulares trabeculas de linina, membrana onde, de regra, é vizivel a diferenciação de 8 ou mais granulos de cromatina. Nas fórmas longas o nucleo principal acha-se situado mais ou menos no meio do eixo lonjitudinal do parazito.

O blefaroplasto mostra, ainda aqui, a nitida estrutura nuclear já descrita. Está situado, óra para frente do nucleo principal, sempre em pozição lateral, nunca no eixo lonjitudinal da celula, óra ao lado do nucleo principal. Nunca, nos flajelados desta zona do tubo dijestivo, é visto o blefaroplasto atraz do nucleo principal.

A baze do aparelho flajelar não oferece neste cazo outras minucias além das referidas; nestes organismos, porém, existe a membrana ondulante, colocada sobre todo o prolongamento delgado anterior da celula e aprezentando, de regra, muitas ondulações.

Além destes flajelados, encontram-se outros, piriformes ou esfericos, nos quais existe prolongamento plasmatico muito fino, munido de membrana ondulante e de flajelo; nestes o flajelo livre é, ás vezes, muito longo, em grande desproporção com as dimensões da celula (Est. 13, Fig. 87).

Estadios intermediarios multiplos, no ponto de vista do aspeto e da fórma geral, existem entre os organismos esfericos pequenos e as fórmas adultas longas de critidias; todos os parazitos, porém, encontrados neste segmento do intestino médio, aprezentam-se munidos de flajelo.

der anderen Kernbestandteile vorangeht. Es bildet dies einen deutlichen Beweis zu Gunsten der Theorie von v. PROWAZEK und HARTMANN, nach welcher das Centriol der Caryosome bei der Mitose der Protozoen dieselbe Funktion hat, wie die Centrosome der Metazoenzelle. Uebrigens haben mich auch vielfältige Beobachtungen über die Kernteilung bei anderen Protozoengruppen vollständig von der Richtigkeit ihrer Anschauungen überzeugt. Auf der anderen Seite dient die, bei diesen Parasiten sehr deutliche und regelmässige, Mitose des Blepharoplasten zur weiteren Bestätigung der Kernnatur dieses Organes, dessen Struktur, ebensowohl im aktiven, wie im Ruhezustande vollständig derjenigen des Hauptkernes gleicht. Meine Resultate stehen somit in vollständiger Uebereinstimmung mit den neuen Befunden von ROSENBUSCH an anderen Trypanosomen und bestätigen die Auffassung der Kernverhältnisse der Trypanosomenzelle, wie sie von SCHAUDINN und seinen Nachfolgern vertreten wird.

Flagellaten des hinteren oder cylindrischen Teiles des Mitteldarmes des Conorhinus.

Noch im vorderen Teile des Mitteldarmes findet man 25 Stunden nach der Blutaufnahme weitere Parasitenformen, welche vorgerückteren Entwicklungsstadien der bereits beschriebenen Formen entsprechen. Doch sind daselbst solche Formen selten und es scheint, dass sie nach ihrer Bildung nur kurze Zeit in diesem Darmabschnitt verbleiben, um bald in den hinteren cylindrischen Teil überzutreten, woselbst sie in grosser Zahl zu finden sind. Im cylindrischen Teile des Mitteldarmes findet man, wie gesagt, von der 15. Stunde an eine schwarze Flüssigkeit, welche das Produkt einer vorgeschritteneren Verdauung des Blutes darstellt; die Parasiten erscheinen jedoch in dieser Flüssigkeit erst nach 25 Stunden und werden hier in Folge einer rapiden Vermehrung äusserst zahlreich, wobei sie sich unbeschränkte Zeit erhalten, trotzdem man die Larven während vieler Tage ohne infektiöse oder anderweitige Nahrung belässt. Diese Flagellaten gleichen in ihrer Morphologie vollständig denjenigen im Darme erwachsener

Nos preparados fixados secos e córados pelo GIEMSA ha só que referir a prezença de abundantes granulos vermelhos, irregularmente espalhados pelo plasma e que são, provavelmente, rezultantes do metabolismo celular. (Fig. 62-69, Est. 11)

Rapida multiplicação experimenta o parazito nesta faze evolutiva, sendo, por isso, encontradas grandes aglomerações de fórmas, ligadas entre si por delgadas pontes plasmaticas, vendo-se tambem critidias plurinucleadas e divizões celulares incompletas. Os flajelados adultos dividem-se lonjitudinalmente, aprezentando diversos aspetos, desde a divizão lonjitudinal binaria, a mais comum, até a divizão lonjitudinal multipla, na qual fórmas aberrantes de critidias, muito volumozas, mostram muitos nucleos.

Os organismos descritos permanecem por tempo indeterminado no intestino e são encontrados nos escrementos, em pequeno numero. Não conhecemos qualquer outra faze que possa ser interpretada como a continuação desta, apezar das numerozas pesquizas realizadas.

Em todos os insetos experimentados, sem uma unica exceção, os fatos passam-se conforme acabámos de referir; algumas experiencias, porém, deixam observar ainda outros fenomenos diferentes que, embóra não esclarecidos de modo satisfatorio, devem ser expostos desde já, visto reprezentarem, a nosso ver, fatos de grande importancia na biolojia do parazito:

Das larvas experimentalmente infetadas algumas mostram, ao lado dos organismos descritos, outros de morfolojia completamente diversa. Assim é que, de 20 a 30 hóras apoz a injestão de sangue, encontrámos em muitas larvas organismos esfericos (Est. 12, Fig. 78—82) munidos de camada periferica condensada, semelhante a membrana, e possuindo grande nucleo que ocupa talvez 2 terços da celula. Este nucleo aprezenta, óra na periferia, óra no centro, um corpusculo de cromatina intensamente córado, com o aspeto de blefaroplasto; este é visto ainda separado do nucleo, colocado na superficie do organismo e fre-

*Conorhinus*wanzen, welche in infizierten Zonen gesammelt wurden. Auch bei diesen bleiben die Flagellaten in voller Tätigkeit, selbst bei lang andauerndem Nahrungsmangel, und zeigen sogar Vermehrungserscheinungen.

In diesem Teile des Mitteldarmes weisen die Flagellaten sehr verschiedene Formen auf, unter denen jedoch die erwachsenen Organismen vom Crithidiatypus vorwiegen. Diese Parasiten sind länglich, von wechselnder Breite, an beiden Enden zugespitzt und zeigen bei der Färbung nach ROSENBUSCH ein alveoläres Protoplasma. Das Vorderende verlängert sich in einen langen dünnen Faden; das hintere endet plötzlich mit einer scharfen Spitze oder zeigt sich abgerundet; endlich kann es auch lang und zugespitzt, aber weniger schlank als das entgegengesetzte, gefunden werden.

Der Kern zeigt eine ähnliche Struktur, wie bei den früher beschriebenen Formen, nämlich: ein Caryosom, in dessen Zentrum man häufig ein Centriol erkennt, eine Kernsaftzone, die von feinen, regelmässigen Linin-Bälkchen durchsetzt ist und eine Kernmembran, von der in der Regel 8 oder mehr Chromatinkörner sich abheben; bei den längeren Formen befindet sich der Hauptkern ungefähr in der Mitte der Längsachse des Parasiten.

Der Blepharoplast zeigt auch hier die bereits beschriebene, deutliche Kernstruktur. Er befindet sich bald zur Seite des Hauptkernes, bald vor demselben, aber immer in seitlicher Lage, niemals in der Längsachse der Zelle; dagegen wird bei den Flagellaten aus diesem Teile des Darmtraktes der Blepharoplast niemals hinter dem Haupkerne gefunden.

Die Basis des Geisselapparates zeigt nur die bereits beschriebenen Details; dagegen findet man bei diesen Organismen eine undulierende Membran, welche dem ganzen dünnen Fortsatze des Vorderendes der Zelle folgt und gewöhnlich viele Wellen zeigt; ausser diesen länglichen Flagellaten findet man andere von Birn- oder Kugelform, bei welchen ein sehr dünner, mit Geissel und undulierender Membran versehener, Plasmavorsatz vorkömmt; bei diesen ist die freie Geissel nicht selten sehr lang und ganz ausser Verhältnis mit den Dimensionen der Zelle (Taf. 2, Fig. 87).

quentemente aprezenta-se bilobado, como se fôra o rezultado da união de 2 corpusculos identicos (Est. 12, Fig. 80—81).

A quantidade destas fórmas era muito variavel, sendo encontradas com abundancia em todas as larvas alimentadas em certos animais e raras ou auzentes nas alimentadas em outros. Do determinismo do aparecimento destes organismos nada sabemos ainda, esperando esclarecel-o bem depressa; é, porém, de notar a frequencia com que os encontrámos nas larvas alimentadas em *Callithrix,* com infeção antiga, ao passo que nas alimentadas em cobaias, mesmo infetadas desde muito, com numerozos parazitos, rarissimas vezes observámos aquellas fórmas. Infelizmente só uzámos, nas pesquizas deste ponto, a fixação a seco e a coloração pelo metodo de GIEMSA, o que explica, em parte, a dificuldade na interpretação dos aspetos observados.

Importantes são ainda as fórmas de esquizogonia que observámos em 3 experiencias, de 140 a 150 horas apoz a refeição, no sangue, em via de dijestão, contido na porção quilifica do intestino médio. Estas se aprezentam constituidas de 8 pequenos organismos mais ou menos ovoides, prezos por massa de plasma central (Est. 12, Fig. 89). Em cada existe um nucleo longo e numa das extremidades um corpusculo de cromatina mais intensamente córado, com o aspeto de blefaroplasto. Aquellas unidades da fórma esquizogonica são vistas, no mesmo material, já separadas (Est. 12, Fig. 90—97), óra em aglomerações, óra izoladas; mostram nitidamente um nucleo principal e um blefaroplasto, tendo, o primeiro, a cromatina, ás vezes, disposta em longa fita, e outras já condensada em corpo ovoide. O blefaroplasto, óra está unido ao nucleo, numa das extremidades (Est. 12, Fig. 91), óra delle afastado, ligado ou não por filamento cromatico (Est. 12, Fig. 95—97). E' aspeto estrutural bem tipico dos tripanozómidas, similar, em alguns pontos, ao que se observa nas unidades da esquizogonia no pulmão e tambem em alguns estadios jovens do flajelado, no sangue. Não é possivel duvidar de que estes organismos reprezentam

Zwischen den kleinen runden und den erwachsenen langen crithidienartigen Formen finden sich vielfache Uebergänge in der allgemeinen Gestalt; doch zeigen alle parasitären Formen aus diesem Teile des Mitteldarmes eine Geissel.

Bei trocken fixierten und mit GIEMSA gefärbten Präparaten ist noch das Vorkommen zahlreicher roter Körnchen zu verzeichnen; dieselben sind unregelmässig im Plasma verteilt und müssen wahrscheinlich als Produkte des Stoffwechsels aufgefasst werden (Fig. 62-69, Taf. 11).

In dieser Entwicklungsphase des Parasiten findet eine rasche Teilung statt, weshalb man oft eine grosse Anhäufung von Formen findet, welche unter sich durch feine Plasmabrücken verbunden sind; auch findet man Crithidienformen mit mehreren Kernen und unvollständige Zellteilungen. Die erwachsenen Flagellaten teilen sich der Länge nach und bieten verschiedene Bilder, von der einfachen longitudinalen Zweiteilung bis zur vielfachen Längsteilung, bei welcher aberrante Crithidienformen von grossem Volumen mehrfache Kerne aufweisen.

Die beschriebenen Organismen verharren unbestimmte Zeit im Darme und werden in geringer Zahl in den Exkrementen gefunden. Trotz zahlreicher Untersuchungen kenne ich keine andere Phase, welche als ein weiterer Zustand aufgefasst werden könnte.

Bei sämtlichen untersuchten Insekten beobachteten wir ausnahmslos die soeben beschriebene Reihe von Erscheinungen; doch wurden in einigen Versuchen noch andere Vorkommnisse beobachtet, welche zwar noch nicht genügend aufgeklärt sind, aber doch hier aufgeführt werden müssen, da sie meiner Ansicht nach wichtige Erscheinungen in der Biologie des Parasiten darstellen.

Bei künstlich infizierten Larven zeigen einige neben beschriebenen Formen andere von ganz verschiedener Morphologie. So finden wir 20 bis 30 Stunden nach der Blutaufnahme bei vielen Larven runde Organismen (Taf. 12, Fig. 78-82), die eine verdichtete periphere Schicht aufweisen, welche einer Membran gleicht, und ausserdem einen grossen Kern besitzen,

faze no ciclo do flajelado no inseto, restando apenas conhecer melhor as fazes precedentes e as posteriores a esta. Acreditamos, impressionado pela semelhança dos aspetos cromaticos, que as fórmas de esquizogonia reprezentam a divizão dos organismos esfericos a que nos referimos, as quais seriam, talvez, ooquinetos, rezultantes de fecundação não surpreendida.

Formas parazitarias na cavidade geral do inseto.

Encontrámos fórmas do flajelado, em 2 cazos, na cavidade geral do *Conorhinus*. Estes haviam sido colhidos em habitações infetadas e estavam sem sugar qualquer vertebrado desde muitos dias, não aprezentando vestijio de sangue no intestino quilifico, tendo, porém, no intestino posterior e nos escrementos grânde numero de fórmas critidiais.

Nas observações sistematicamente realizadas não conseguimos ainda surpreender parazitos na cavidade geral, pelo que pensámos ser a permanencia delles ali muito tranzitoria, depressa passando ás glandulas salivares.

As fórmas vistas nas duas experiencias são organismos aprezentando longa faixa de cromatina no nucleo e grande blefaroplasto oval, óra situado na extremidade posterior, óra ainda distante desta; possuem membrana ondulante e flajelo livre e aprezentam organização morfologica muito semelhante á das fórmas encontradas nas glandulas salivares (Est. 11, Fig. 71-73).

Fórmas parazitarias encontradas nas glandulas salivares do Conorhinus.

Em 3 experiencias encontrámos, em «*frottis*» de glandulas salivares de conorrinos, fórmas de evolução do *Schizotrypanum cruzi,* as quais reprezentam, sem duvida, os organismos que são inoculados no vertebrado.

Uma das verificações foi feita em inseto adulto que havia picado um *Callithrix* infetado, 12 dias antes. Nesta, em exame a fresco do material das glandulas salivares (glandulas

welcher vielleicht zwei Drittel der Zelle ausfüllt. Dieser Kern zeigt bald im Zentrum, bald an der Peripherie ein intensiv gefärbtes Chromatinkörperchen vom Aussehen eines Blepharoplasten; dasselbe wird auch, vom Kerne getrennt, an der Oberfläche des Organismus gefunden und ist ausserdem oft zweilappig, als ob es aus der Vereinigung zweier gleichartigen Körperchen enstanden wäre (Tafel 12, Fig. 80—81).

Die Zahl dieser Formen war sehr schwankend; ich fand sie in grosser Zahl in allen Larven, welche an bestimmten Tieren gefüttert wurden, dagegen selten oder auch gar nicht bei solchen, deren Nahrung von anderen Tieren stammte. Ueber die Ursache des Auftretens dieses Organismus ist noch nichts bekannt, doch hoffe ich, dieselbe baldigst aufzuklären; jedenfalls ist die Häufigkeit hervorzuheben, mit welcher ich ihn bei den an seit langem infizierten *Callithrix*-Aeffchen gefütterten Larven gefunden habe, während bei andern, mit dem Blute von Meerschweinchen ernährten trotz lange dauernder Infektion und zahlreichen Parasiten im peripherischen Blute diese Formen nur sehr selten beobachtet wurden. Leider benutzte ich bei den diesbezüglichen Untersuchungen nur die trockene Fixation und Färbung nach GIEMSA, was einigermassen die Schwierigkeit der Deutung der beobachteten Bilder erklärt.

Von Wichtigkeit sind auch die Schizogonieformen, welche ich in drei Versuchen, 140 bis 150 Stunden nach der Blutaufnahme, in teilweise verdautem Blute auffand, welches im vorderen Teile des Mitteldarmes enthalten war. Diese zeigen sich aus acht kleinen, nahezu eiförmigen Organismen gebildet, welche durch eine zentrale Plasmamasse zusammenhängen (Taf. 12, Fig. 89); in jedem derselben findet sich ein länglicher Kern und an einem seiner Enden ein intensiver gefärbtes Chromatinkörperchen vom Aussehen eines Blepharoplasten. Die einzelnen Individuen der Schizogonieform werden in demselben Materiale auch getrennt (Taf. 12, Fig. 90—97), bald einzeln, bald in Haufen, gefunden und lassen einen Hauptkern und Blepharoplasten deutlich erkennen; ersterer zeigt das Chromatin manchmal in langer Band-

principais) observámos flagelados com movimentos ativos semelhantes aos dos parazitos vistos no liquido da cavidade geral. Em «*frottis*» fixados a seco e córados pelo metodo de GIEMSA, observámos 2 fórmas de aspetos bem distintos. Uma dellas aprezenta-se como organismos compridos e delgados, tendo a cromatina nuclear disposta ainda em faixa lonjitudinal, ocupando mais ou menos $^1/_4$ do comprimento da celula; o blefaroplasto aprezenta-se como um grande corpusculo cromatico, óra situado atraz do nucleo e deste pouco distante (Est. 11, Fig. 74 e 75) óra colocado na extremidade posterior da celula (Est. 12, Fig. 76). Em algumas fórmas não vimos flagelo nem membrana ondulante (Est. 12, Fig. 76) o que atribuimos a defeito de cóloração, porquanto em outras observações quazi todos os parazitos mostraram membrana ondulante, flajelo aderente e flajelo livre (Est. 11, Fig. 74 e 75).

A segunda fórma observada era constituida por organismo largo, possuindo blefaroplasto muito menor que o da fórma precedente e situado exatamente na extremidade posterior; um nucleo principal mais ou menos ovoide, com a cromatina de aspeto muito diverso do das fórmas delgadas. Este organismo, nas nossas observações, era muito mais raro e não observámos correspondentes delle na cavidade geral (Est. 12, Fig. 77.)

As outras duas observações de flajelados nas glandulas salivares foram feitas em insetos colhidos nas habitações infetadas. Em tal cazo, a maior quantidade de hemipteros, embora aprezentando flajelados no intestino posterior, nada mostram nas glandulas salivares; certo numero delles, porém, em relação centezimal não determinada, acha-se infetado e são infetantes, sendo vistos nas glandulas salivares os parazitos com a morfolojia descrita. Esta observação, aliaz, é confirmada nas tentativas de infeção por picada de conorrinos colhidos em rezidencias humanas, nas quais só pequena proporção de insetos é infetante.

form und manchmal zu einem eiförmigen Körper verdichtet. Der Blepharoplast ist bald an einem Ende des Nucleus gelegen und mit diesem verbunden (Taf. 12, Fig. 91), bald von diesem entfernt, getrennt oder durch einen Chromatinfaden verbunden (Taf. 12, Fig. 95-97). Es ist dies ein typisches Strukturbild der Trypanosomen, das in manchen Punkten demjenigen gleicht, welches man an den einzelnen Individuen der Schizogonieformen der Lunge und den jugendlichen Blutflagellaten beobachtet. Man kann nicht bezweifeln, dass diese Formen eine Phase der Entwicklung des Flagellaten im Insekte darstellen, wobei uns nur eine bessere Kenntnis der vorhergehenden und nachfolgenden Stadien fehlt. Unter dem Eindruck der Uebereinstimmung der chromatischen Bilder glaube ich, dass die Schizogonieformen die Teilung der erwähnten Formen darstellen, welche vielleicht Ookineten sind, die aus einer, nicht im Augenblicke des Bestehens beobachteten, Befruchtung hervorgehen.

Parasitäre Formen aus der Leibeshöhle des Insektes.

Ich habe zwei mal Flagellaten in der Leibeshöhle von Exemplaren von *Conorhinus* gesammelt, welche in infizierten Wohnungen gefunden waren. Sie hatten seit langer Zeit an keinem Wirbeltiere gesaugt und zeigten keine Spur von Blut im Chylusdarm, dagegen im Enddarm und in den Exkrementen eine grosse Zahl von Crithidienformen.

Bei systematisch angestellten Beobachtungen gelang es mir bisher nicht, den Parasiten in der Leibeshöhle zu treffen; ich glaube daher, dass er sich daselbst nur ganz vorübergehend aufhält, indem er sehr bald in die Speicheldrüsen übertritt.

Die Organismen, welche bei den 2 Versuchen gefunden wurden, zeigen einen langen Chromatinstreifen im Kerne und einen grossen ovalen Blepharoplasten, der bald am Hinterende, bald von demselben entfernt liegt; sie besitzen eine freie Geissel und eine undulierende Membran und zeigen eine sehr ähnliche Bildung, wie die Formen, die in den Speicheldrüsen gefunden werden (Fig. 71—73, Taf. 11).

Cultura artificial do parazito.

O *Schrizotypanum cruzi* é facilmente cultivavel em agar-sangue, segundo o metodo de NOVY e MAC NEAL. Procedemos do modo seguinte:

Sangrámos coelhos no coração, — processo melhor que o da sangria nas carotidas, podendo ser retirados, em cada sessão, até 40 c c.[3] de sangue, sem sacrificio do animal. — Misturámos partes iguais de sangue desfibrinado com agar fundido e mantido a 50°. Na agua de condensação, geralmente abundante, fizémos a sementeira.

Exames sistematicos mostram as primeiras modificações do flajelado, desde a sexta hora, sendo aqui, como no tubo dijestivo do inséto, fenomenos iniciais a migração do nucleo blefaroplasto para as proximidades do nucleo principal, a perda da membrana ondulante e do flajelo e, por ultimo, o arredondamento do parazito (Est. 13, Fig. 23a-23b). Em seguida dá-se rapida multiplicação, de modo que, apoz 20 hóras, começam a aparecer na cultura novos organismos, de fórma ovoide ou esferica, rezultantes da divizão dos flajelados semeados (Est. 12, Fig. 98—103 e Est. 13, Fig. 23).

Ha agóra predominancia, a principio, de pequenos organismos piriformes aflajelados (Est. 12 e Fig. 99-102) que mostram, quando córados pelo metodo de ROSENBUSCH, estrutura identica á das fórmas similares dos conorrinos (Est. 13, Fig. 23). Nos preparados pelo GIEMSA, nestes organismos, o nucleo principal é visto como grande massa de cromatina, tendo, num dos pontos da periferia, o blefaroplasto.

Os organismos esfericos, de dimensões variaveis, não oferecem tambem outras minucias de estrutura, além das descritas no inséto. Nos preparados pelo GIEMSA, além dos granulos de volutina, vêm-se frequentemente, no plasma, muitos vacuolos.

Os organismos esfericos e piriformes se aprezentam em ajuntamentos, constituidos, ás vezes, de numerozos individuos, vendo-se entre elles muitos com os nucleos em divizão,

Parasitäre Formen in den Speicheldrüsen des Conorhinus.

Bei drei Versuchen fand ich in Ausstrichpräparaten von den Speicheldrüsen der *Conorhinus*wanzen Entwicklungsphasen des *Schizotrypanum cruzi,* die zweifellos die Form darstellen, welche auf Wirbeltiere übertragen wird. Der eine Befund wurde bei einem ausgewachsenen Conorhinus gemacht, welcher 12 Tage vorher ein Exemplar von *Callithrix* gestochen hatte. Dabei fand ich bei frischer Untersuchung des Materials der Hauptspeicheldrüsen Flagellaten, deren sehr lebhafte Bewegungen an die Parasiten aus der Leibeshöhle erinnerten. In trocken fixierten und nach GIEMSA gefärbten Ausstrichen beobachtete ich zweierlei Formen von sehr verschiedenem Aussehen: eine derselben erscheint als sehr langer und dünner Organismus, dessen Kernchromatin noch als langes Band angeordnet ist, welches ungefähr dem vierten Teile der Zelle entspricht; der Blepharoplast zeigt sich als grosses Chromatinkörperchen bald hinter dem Kerne und in dessen Nähe (Tafel 11, Fig. 74 und 75), bald am Hinterende der Zelle (Taf. 12, Fig. 76), bei einigen Formen fand ich weder Geissel noch undulierende Membran (Taf. 12, Fig. 76), was ich einer fehlerhaften Färbung zuschreibe, denn in anderen Beobachtungen zeigten fast alle Parasiten eine undulierende Membran und eine zum Teile adhärente, zum Teile freie Geissel (Taf. 11, Fig. 74 und 75).

Die zweite beobachtete Form bestand in einem breiten Organismus, dessen Blepharoplast viel kleiner war, als bei der vorigen Form, dabei genau am Hinterende gelagert; sie besitzt ferner einen nahezu eiförmigen Hauptkern, dessen Chromatin sich von demjenigen der Hauptform sehr unterscheidet. Dieser Organismus war in meinen Beobachtungen viel seltener; auch habe ich in der Leibeshöhle keine entsprechenden Formen gefunden.

Die anderen beiden Beobachtungen von Flagellaten aus Speicheldrüsen wurden bei Wanzen gemacht, welche in infizierten Wohnungen gefangen wurden. In diesem Falle

outros ligados entre si por filamentos de plasma, e, finalmente, organismos com nucleos e blefaroplastos multiplos.

Tornam-se depois flajelados estes organismos, atinjindo o estadio de critidias adultas. Nestas, como nas fórmas anteriores, a estrutura celular é de todo identica á das fazes correspondentes no invertebrado, pelo que nos dispensamos de referil-a. E tambem aqui estamos procedendo a pesquiza sobre os processos de divizão dos nucleos, dos quais daremos, mais tarde, conhecimento.

Nas culturas antigas é frequente observarem-se fórmas aberrantes de critidias, de grandes dimensões, com divizão multipla (Fig. 108 e 109 da Est. 12). As critidias adultas, simultaneamente com organismos piriformes e esfericos, permanecem longamente vivos nas culturas, até 2 mezes, sendo pozitivas, quazi sempre, as 2 primeiras sementeiras.

Nas culturas, portanto, o *Schizotrypanum cruzi* porta-se de modo identico áquelle estudado no tubo dijestivo do hemiptero, havendo perfeita semelhança em quazi todas as fazes das evoluções na cultura e no hospedeiro intermediario. Não encontrámos, porém, nas culturas artificiais, os organismos esfericos, cercados de pelicula condensada, nem as fórmas de esquizogonia assinaladas no tubo dijestivo do inséto. Em compensação, duas culturas de sangue de sagui mostraram, no fim de 10 dias, fórmas parazitarias que não haviamos observado ainda. Nestes, vimos flajelados com blefaroplasto colocado atraz do nucleo principal, achando-se este ultimo com a cromatina disposta em longa faixa lonjitudinal. E' um aspeto muito semelhante ao observado em parazitos adultos das glandulas salivares e tambem do sangue periferico.

Outra fórma tambem encontrada só duas vezes nas culturas, aprezentava-se ovoide, tendo nucleo unico com a cromatina disposta em dois lóbos. O aspeto desta fórma, nos preparados, fixados secos e córados pelo GIEMSA, lembrava muito o ooquineto do hemoproteo. Indecizas, porém, como se aprezentam, estas fazes ultimas exijem maiores e

zeigte die Mehrzahl der Hemipteren zwar Flagellaten im Hinterdarm, aber keine in den Speicheldrüsen; ein unbestimmter, aber sehr kleiner (nur nach Hundertsteln zählender) Teil war gleichzeitig infiziert und infizierend, indem er in den Speicheldrüsen die beschriebenen Parasiten enthielt. Diese Beobachtung wird übrigens bestätigt durch die Versuche, mittelst des Stiches von in menschlichen Wohnungen gesammelten Conorhinen zu infizieren, wobei nur ein kleiner Teil dieser Wanzen sich infektiös erweist.

Künstliche Kultur des Parasiten.

Das *Schizotrypanum cruzi* lässt sich leicht nach NOVY und MAC NEAL auf Blutagar züchten. Bei meinen Kulturen verfahre ich folgendermassen: Ich entnehme das Blut aus dem Herzen von Kaninchen, ein Prozess, der dem Durchschneiden der Karotiden vorzuziehen ist, da man, ohne das Tier zu opfern, in jeder Sitzung bis 40 ccm. Blut entnehmen kann. Ich mische gleiche Teile des defibrinierten Blutes mit gleichen Teilen geschmolzenen, bei 50° aufbewarten Agars und übertrage auf das gewöhnlich reichliche Kondenswasser.

Systematische Untersuchungen zeigen die ersten Modifikationen der Flagellaten von der 6. Stunde an, wobei hier, wie im Darmkanale des Zwischenwirtes, die Anfangserscheinungen folgende sind: Wanderung des Blepharoplasten in die Nähe des Hauptkernes, Verlust der Geissel und undulierenden Membran, endlich die Abrundung des Parasiten (Taf. 13, Fig. 23 a — 23 b). Hierauf folgt eine rasche Vermehrung, sodass nach 20 Stunden in der Kultur neue Organismen erscheinen, welche aus der Teilung der eingesäten Flagellaten enstehen und eine runde und eiförmige Gestalt besitzen (Taf. 12, Fig. 98 — 103 und Taf. 13, Fig. 23).

Anfangs herrschen kleine, birnförmige, geissellose Organismen (Taf. 12, Fig. 99—102) vor, welche bei der Färbung nach ROSENBUSCH dieselbe Struktur zeigen, wie die entsprechenden Formen aus dem *Conorhinus*. In GIEMSA-Präparaten sieht man in diesen

mais metodicas pesquizas, pelo que deixamos de aprezentar agóra os dezenhos e os dados sobre a estrutura dellas.

Transmissão da infeção pela picada do Conorhinus e por injeção dos flajelados do tubo dijestivo e das culturas. Virulencia variavel do parazito. Evolução da infeção nos animais de laboratorio.

Conforme referimos, o primeiro cazo de infeção pelo *Schizotrypanum cruzi* foi obtido num *Callithrix* picado por alguns conorrinos trazidos da zona contaminada. Os insétos estavam, havia mais de 8 dias, sem refeição em qualquer vertebrado, o que indica, já neste primeiro cazo, a auzencia de transmissão mecanica do parazito. Maiores ensinamentos, porém, oferecem as experiencias seguintes, realizadas com larvas, nacidas no laboratorio, como passamos a referir:

Quatro larvas, no 5.º dia apoz a eclosão, picaram um *Callithrix* infetado desde 1 mez, com flajelados não muito abundantes no sangue periferico.

Duas destas larvas, 10 dias depois, picaram uma cobaia que morreu no 6.º dia aprezentando no pulmão grande numero de fórmas de esquizogonia e no sangue periferico alguns parazitos intraglobulares. As 2 larvas restantes infetaram mais 2 cobaias, uma das larvas no 20.º e a outra no 25.º de infeção. Uma dessas cobaias morreu no 7.º dia apoz a picada, com grande numero de fórmas de esquizogonia no pulmão, sem flajelados, apreciaveis em exame rapido, no sangue periferico; a outra cobaia morreu no 12.º dia, aprezentando algumas fórmas de esquizogonia no pulmão e raros flajelados no sangue periferico.

Nova experiencia, com 6 larvas, 3 dellas alimentadas em *Callithrix* com infeção antiga e 3 alimentadas em cobaia com numerozos parazitos no sangue periferico, deu o seguinte rezultado: as 3 larvas, infetadas no *Callithrix,* picaram no 8.º dia uma cobaia, que mostrou parazitos no sangue periferico 15 dias depois; as larvas alimentadas na co-

Formen den Hauptkern als grosse Chromatinmasse, welche an einem beliebigen Punkte der Peripherie den Blepharoplasten aufweist.

Auch die runden Formen von wechselnden Dimensionen zeigen nur die bei Insekten beschriebenen Strukturverhältnisse. In Giemsa-Präparaten sieht man im Plasma ausser den Volutinkörperchen nicht selten zahlreiche Vakuolen.

Runde und birnförmige Formen zeigen sich in Anhäufungen, die oft von sehr zahlreichen Individuen gebildet sind, unter welchen viele Kernteilungen aufweisen, andere mehrfache Blepharoplasten und Kerne enthalten und wieder andere durch Plasmafäden gegenseitig verbunden sind.

Diese Organismen bilden dann eine Geissel und gehen in die erwachsene Crithidienform über, bei welcher, wie bei den vorigen, die Zellstruktur den entsprechenden Formen aus der Wanze entspricht, weshalb ich sie auch nicht beschreibe. Ich untersuche auch bei diesen den Kernteilungsprozess und werde darüber später berichten. In älteren Kulturen beobachtet man häufig abweichende Crithidienformen von grossen Dimensionen und in mehrfacher Teilung begriffen (Taf. 12, Fig. 108 u. 109). Kugel- und Birnformen bleiben neben den erwachsenen Crithidien in den Kulturen lange Zeit — bis zu 2 Monaten — am Leben und die beiden ersten Ueberimpfungen gehen fast immer gut an.

Das *Schizotrypanum cruzi* verhält sich demgemäss in den Kulturen ganz wie im Darme der Wanze, sodass fast alle Entwicklungsphasen vollständig übereinstimmen. Doch fand ich in den künstlichen Kulturen weder die runden, von einer verdichteten Membran umgebenen Organismen, noch die im Darmkanal nachgewiesenen Schizogonieformen. Dagegen zeigten 2 Kulturen aus dem Blute des Pinseläffchens nach 10 Tagen parasitäre Formen, welche ich noch nicht beobachtet hatte. Hier sah ich Flagellaten mit hinter dem Hauptkerne liegenden Blepharoplasten, wobei der letztere das Chromatin zu einem langem Streifen angeordnet zeigte. Dieses Bild gleicht demjenigen des erwachsenen Parasiten aus dem peripheren Blute und den Speicheldrüsen.

baia picaram sem rezultado novas cobaias no 8.º, no 14.º e no 20.º dias.

Grande numero de outras experiencias, com larvas nutridas em cobaias intensamente infetadas, foram negativas, não obstante aprezentarem todas as larvas, com absoluta constancia, as fórmas de critidias que referimos no intestino médio. Tambem o exame do liquido da cavidade geral e as pesquizas das glandulas salivares destas larvas deram rezultados negativos. Nas larvas cujas picadas foram contaminantes para cobaias não fizemos, devido ao intuito de apreciar o prazo maximo da condição infetante, pesquizas complementares nas glandulas salivares, perdendo as larvas sem ter tido esclarecimento importante que tais pesquizas poderiam trazer.

Temos diversas experiencias de infeção de cobaias por picada de conorrinos adultos; nestas, porém, devido á possibilidade de serem infetantes os insétos colhidos na zona contaminada, não se póde apreciar o tempo de evolução completa do parazito. Da relação centezimal de conorrinos infetantes, quando colhidos em habitações humanas, não temos por emquanto idéa exata; é certo, porém, que naquella relação influe especialmente a procedencia dos insétos. Tivemos coleções de conorrinos, da mesma procedencia, nas quais existiam muitos insétos infetantes; quando com outras coleções, de procedencia diversa, as tentativas de infeção foram todas negativas.

Podemos, das experiencias até agora realizadas, tirar as concluzões seguintes sobre a transmissão do *Schizotrypanum cruzi* pela picada do *Conorhinus:*

1.º Certa proporção, indeterminada, de conorrinos colhidos nas habitações de zona contaminada, é infetante para os vertebrados.
2.º As larvas creadas no laboratorio e alimentadas em animais contaminados, mesmo com numerozos parazitos no sangue periferico, nem sempre se tornam infetantes, apezar de aprezentarem flajelados no intestino médio.
3.º As larvas que, em tal cazo, se tornam contaminantes, só o são, desde o 8.º ou 10.º

Eine zweite Form wurde gleichfalls zwei mal in den Kulturen beobachtet; sie ist oval und zeigt einen einzelnen Kern, dessen Chromatin in 2 Lappen angeordnet ist. Die Form derselben erinnert in trocken fixierten und nach GIEMSA gefärbten Präparaten sehr an den Ookineten des *Hämoproteus.* Da sich jedoch diese letzten Formen nicht sehr deutlich erscheinen, sind noch mehr eingehende und methodische Untersuchungen nötig, weshalb ich jetzt keine Zeichnungen und nähere Angaben über ihre Struktur gebe.

Uebertragung der Infektion durch den Stich des Conorhinus, die Flagellaten aus dem Darmkanal und die Kulturformen.

Wie schon berichtet, wurde die erste Infektion durch *Schizotrypanum cruzi* bei einem Pinseläffchen beobachtet, an welchem aus infizierter Zone stammendende Conorhinen gesogen hatten. Dieselben hatten seit mehr als 8 Tagen kein Blut aufgenommen, was bereits in diesem ersten Falle die mechanische Uebertragung des Parasiten ausschloss. Genauere Aufschlüsse erhielt ich aus den folgenden Versuchen mit Larven, die im Laboratorium ausgeschlüpft waren:

Fünf Tage nach dem Ausschlüpfen sogen 4 Larven an einer seit einem Monate infizierten *Callithrix* mit sehr zahlreichen Flagellaten im peripheren Blute. 10 Tage darauf stachen 2 dieser Larven ein Meerschweinchen; dasselbe starb am 6. Tage und zeigte in den Lungen zahlreiche Schizogonieformen und im peripherischen Blute einige intraglobuläre Parasiten. Die 2 übrigen Larven infizierten 2 Meerschweinchen, eine derselben am 20., die andere am 25. Tage nach der Infektion. Das eine Meerschweinchen starb 7 Tage nach den Stichen mit zahlreichen Schizogonieformen in den Lungen, während im peripherischen Blute eine nicht sehr eingehende Untersuchung keine Flagellaten nachwies; das andere Versuchstier starb am 12. Tage und zeigte in den Lungen einige Schizogonieformen nebst spärlichen Flagellaten im peripheren Blute.

Ein neuer Versuch wurde mit 6 Larven angestellt; davon hatten 3 an einer seit lan-

dia apoz a refeição de sangue infetado, conservando essa condição por espaço de tempo longo e ainda indeterminado.

4.º As picadas de larvas, 2 ou 3 dias depois de uma refeição em animal infetado, não contaminam os vertebrados.

Claro está que estas concluzões, embora bazeadas em experiencias izentas de qualquer cauza de erro, não trazem ao assunto esclarecimento completo, sendo necessario aguardar o rezultado das novas pesquizas a que procedemos atualmente.

Obtivémos, inoculando material do intestino médio de conorrinos adultos, colhidos em habitações humanas e sem prévia refeição contaminada no laboratorio, a infeção de diversas cobaias, as quais chegaram a aprezentar, no sangue periferico, numerozos flajelados.

Com o material do intestino médio de lárvas, infetadas no laboratorio, conseguimos tambem a infeção de diversas cobaias. Fizemos inoculações, neste cazo, depois de 6 dias da refeição contaminante, não tendo ainda experimentado antes daquelle prazo, o que devemos fazer ainda. Nas inoculações do material do intestino de larvas e de conorrinos adultos, tivemos alguns rezultados negativos, sem que possamos por emquanto explicar a causa delles. Aliaz, ainda neste ponto, para maior segurança das concluzões, devemos voltar á novas pesquizas.

A inoculação de cultura não oferece concluzão diversa da inoculação do material do intestino médio; muitas vezes infetámos cobaias com inoculações de culturas, falhando porém, algumas das experiencias realizadas.

Variabilidade na virulencia do Schizotrypanum cruzi.

A virulencia do *Schizotrypanum cruzi* é influenciada por diversos fatores, cuja natureza e cujos efeitos não conhecemos ainda, de modo exato.

Passajens sucessivas do parazito, atravez de animais sensiveis atenuam, sem duvida, a virulencia delle; por outro lado, o parazito,

gem infizierten *Callithrix*, die anderen 3 an einem Meerschweinchen mit zahlreichen Parasiten im peripheren Blute gesogen. Das Resultat des Versuches war folgendes: die 3 am Affen infizierten Larven stachen am 8. Tage ein Meerschweinchen, welches 15 Tage später Parasiten im peripheren Blute zeigte; die Larven vom Meerschweinchen stachen am 8., 14. und 20. Tage andere Meerschweinchen mit negativem Resultate.

Noch viele andere Versuche mit Larven, die an stark infizierten Meerschweinchen gesogen hatten, blieben resultatlos, obwohl die Larven mit absoluter Sicherheit die erwähnten Crithidienformen im Mitteldarme aufwiesen. Ebenso blieben die Untersuchungen der Flüssigkeit aus der Leibeshöhle und die der Speicheldrüsen ohne Resultat. Dagegen machte ich keine Kontrollversuche an den Speicheldrüsen der Larven, deren Stich Meerschweinchen infiziert hatte, da ich dieselben zur Feststellung der längsten Dauer der Infektion gebrauchte; so verlor ich die Larven, ohne die wichtige Aufklärung zu erhalten, welche diese Versuche hätten geben können.

Ich machte auch verschiedene Infektionsversuche am Meerschweinchen, die ich von erwachsenen Conorhinen stechen lies; doch liess sich bei solchen die Entwicklungsdauer des Parasiten nicht feststellen, weil diese in infizierter Zone gesammelten Insekten schon infektiös sein konnten. Ueber den Prozentsatz der Infektiosität der in menschlichen Wohnungen gefangenen Conorhinen habe ich keinen richtigen Begriff, doch steht soviel fest, dass derselbe besonders von der Herkunft der Tiere abhängt. So fanden wir in einer Sendung von Conorhinen von einem Orte zahlreiche infektiöse Exemplare, während bei Sendungen von anderer Herkunft alle Infektionsversuche resultatlos blieben.

Aus den bisher angestellten Untersuchungen über die Uebertragung des *Schizotrypanum cruzi* durch den Stich des *Conorhinus* kann ich folgende Schlüsse ziehen:

1. Ein unbestimmter Prozentsatz von aus Wohnungen der infizierten Zone stammenden Conorhinen ist für Wirbeltiere infektiös.

atenuado, readquire a virulencia inicial, quando inoculado em outra especie animal. As infeções produzidas nas cobaias por picadas de conorrinos são, de regra, mais graves que as produzidas por inoculações de sangue contaminado. As primeiras matam o animal em espaço de tempo variavel, comumente de 5 a 10 dias, ao passo que as ultimas permitem a sobre-vida até de 2 mezes. E' frequente, nas infeções pelo *Conorhinus,* as cobaias morrerem ainda com auzencia de flajelados no sangue periferico, aprezentando no pulmão grande numero de fórmas esquizogonicas.

As reinoculações de sangue de cobaias, inicialmente infetadas pelo inséto, modificam consideravelmente, tanto a ação patojenica, quanto a atividade de multiplicação do parazito, de modo que, apoz certo numero de reinoculações, as infeções obtidas tornam-se menos intensas e a morte das cobaias mais demorada. Si, porém, inoculamos o parazito assim tratado num *Callithrix,* parece que elle readquire, em parte, a virulencia perdida.

Influe, ainda na intensidade da parazitoze, a via de introdução do flajelado, parecendo, de nossas experiencias, serem as inoculações intra-peritoneais as que produzem infeções maiores e mais rapidamente mortais.

Sobre este ponto merecem referencia especial nossas observações sobre o tripanozómida de proveniencia humana: Inoculámos, como dissémos, 2 cobaias e um *Callithrix,* com sangue da primeira doente, morrendo aquellas duas em poucos dias e sobrevivendo o *Callithrix* 2 mezes, vindo a morrer em estado de grande emagrecimento e de consideravel hipoglobulia. Inoculámos, com o sangue do *Callithrix,* 6 cobaias que mostraram, apoz 15 dias, parazitos no sangue periferico, morrendo todas dentro de 1 mez. Com sangue destas cobaias inoculámos novas, que só muito tarde, 20 ou 30 dias depois, aprezentaram parazitos na periferia. Estas cobaias viveram mais de dois mezes, morrendo em varios periodos, quazi todas mostrando, na ocazião da morte, fórmas esquizogonicas no pulmão. Houve, portanto, nesta série de experiencias uma primeira atenuação de virulencia pela passajem no *Callithrix,* visto como

2. Im Laboratorium aufgezogene, an infizierten Tieren mit zahlreichen Parasiten im peripheren Blute gefütterte, Conorhinuslarven zeigen sich nicht immer infektiös, obwohl sie Flagellaten im Mitteldarme beherbergen.
3. Die Larven, welche unter solchen Verhältnissen sich infektiös erweisen, tun es erst am 8. bis 10. Tage nach der Aufnahme des infizierten Blutes, behalten aber diese Eigenschaft während eines langen Zeitraumes, dessen Grenzen noch nicht bestimmt sind.
4. 2 bis 3 Tage nach Aufnahme des infizierten Blutes sind die Stiche der Larven nicht infektiös für Wirbeltiere.

Obwohl die Schlüsse auf von Fehlerquellen reinen Versuchen beruhen, können sie doch natürlicherweise die Frage nicht vollständig aufklären; deswegen muss das Resultat neuer Versuche, mit denen wir zur Zeit beschäftigt sind, abgewartet werden.

Durch Einspritzung des Mitteldarminhaltes erwachsener, aus menschlichen Wohnungen stammender Conorhinen, die im Laboratorium kein infiziertes Blut aufgenommen hatten, erhielt ich eine Infektion bei verschiedenen Meerschweinchen, welche später im Blute zahlreiche Flagellaten aufwiesen. Auch mit Material aus dem Mitteldarm von — im Laboratorium infizierten — Larven, bewirkte ich eine Infektion bei verschiedenen Meerschweinchen. Dabei stammte das Infektionsmaterial aus der Zeit nach dem 6. Tage der Infektion; Versuche vor dieser Zeit wurden nicht angestellt, sollen aber noch gemacht werden. Bei der Uebertragung von Material aus dem Darme von Larven und erwachsenen Exemplaren dieser Wanzen erhielten wir einige negative Resultate, ohne zur Zeit die Ursache derselben erklären zu können. Uebrigens werden wir auch hierüber zu grösserer Sicherheit in unseren Schlüssen weitere Untersuchungen anstellen.

Die Uebertragung von Kulturen gestattet keine anderen Schlüsse, als die Einspritzung von Material aus dem Mitteldarme; manchmal infizierte ich Meerschweinchen mit Einsprit-

o parazito humano, que a principio matou cobaias em 5 dias, só o fez depois em 1 mez ou pouco menos. Segunda e mais intensa atenuação sofreu o virus no organismo das cobaias, conforme o rezultado das reinoculações, que só mataram os animais depois do 2.º mez.

A grande virulencia do parazito humano para as cobaias revelou-se outra vez na inoculação de sangue do doente JOSE, em dois destes animais, que morreram dentro de poucos dias e na terceira experiencia, na qual obtivémos a infeção de uma cobaia (que permaneceu viva mais de um mez) a quantidade de sangue inoculado foi de menos de $^1/_2$ cc., quando nos 2 primeiros cazos injetámos no peritoneo das cobaias, de 1 a 2 ccm.

Convém assinalar aqui a intensidade diversa da infeção dos doentes, o que impossibilita tirar destes rezultados, a respeito da virulencia do parazito, concluzões definitivas. De fato no primeiro doente havia flajelados no sangue periferico, apreciaveis mesmo em exame rapido, ao passo que nos outros só a inoculação de animais sensiveis póde revelar a existencia da infeção.

Evolução da molestia na cobaia e no Callithrix.

A evolução da esquizotripanozomiase nos animais de experiencia depende, sobretudo, da proveniencia do parazito. Póde ser estabelecida como regra, a morte rapida dos animais, ás vezes com flajelados raros ou sem elles no sangue periferico, quando infetados pelo *Conorhinus*. Nas inoculações sucessivas, porém, na mesma especie animal, a sobrevida póde ser longa, atinjindo 2 mezes e mais na cobaia e no *Callithrix*. Ha, nestes cazos, periodos de maior abundancia de parazitos no sangue periferico. Em alguns animais observámos dezaparecimento rapido dos flajelados da periferia, lembrando as crizes verificadas em algumas espiroquetozes. Outra observação, muitas vezes repetidas, é a da morte dos animais em periodo de ativa esquizogonia do parazito. As cobaias aprezentam, nestas condições, os capilares do pulzung von Kulturen, während wieder andere Versuche resultatlos blieben.

Schwankungen in der Virulenz von Schizotrypanum cruzi.

Die Virulenz von *Schizotrypanum cruzi* steht unter dem Einflusse verschiedener Faktoren, deren Natur und Wirkungen noch nicht genau bekannt sind. Wiederholte Passagen durch empfindliche Tiere schwächen die Virulenz in deutlicher Weise ab; andererseits nimmt der Parasit nach der Abschwächung die ursprüngliche Virulenz wieder an, wenn er auf eine andere Tierart übertragen wird. Die Infektionen, welche bei Meerschweinchen durch die Stiche von Conorhinen erzeugt werden, sind in der Regel schwerer, als diejenigen, die durch Einführung infektiösen Blutes entstehen. Erstere töten die Tiere nach einem wechselnden Zeitraum von gewöhnlich 5 bis 10 Tagen, während letztere ein Ueberleben bis zu 2 Monaten gestatten. Bei Infektion durch Conorhinen sterben die Meerschweinchen nicht selten schon, wenn noch keine Flagellaten im peripheren Blute vorkommen, während in den Lungen zahlreiche Schizogonieformen zu finden sind.

Die Ueberimpfung des Blutes von ursprünglich durch den Stich von Conorhinen infizierten Meerschweinchen bewirkt eine beträchtliche Aenderung in Beziehung auf die Vermehrungsenergie der Parasiten, so dass nach einer gewissen Zahl von Passagen die erzeugten Infektionen weniger intensiv werden und der Tod der Meerschweinchen sich verzögert. Uebertragen wir jedoch den so behandelten Parasiten auf eine *Callithrix*, so scheint er die verlorene Virulenz teilweise wieder zu gewinnen.

Auch der Ort der Einimpfung beeinflusst die Intensität des parasitären Prozesses; nach meinen Experimenten scheinen intraperitoniale Einspritzungen die stärksten und am schnellsten tödtlichen Infektionen hervorzurufen.

Hier verdienen die Versuche mit Trypanosomen menschlicher Herkunft besonders Erwähnung; wie berichtet, infizierte ich mit

mão repletos de fórmas esquizogonicas, coincidindo o fato com diminuição e ás vezes dezaparecimento dos flajelados do sangue periferico.

Entre os sintomas que se observam nos animais de experiencia, além de elevação termica, grande emagrecimento e hipoglobulia, devemos referir o enfartamento ganglionar generalizado, em alguns cazos muito consideravel, e afeções oculares. Esta é muito frequente no *Callithrix* e não raro determina a perda completa da vizão. Finalmente, registrámos a observação frequente da morte dos animais em convulsão.

Considerações gerais.

I. Sistematica.

A existencia de relações filojeneticas, muito estreitas, entre os tripanozomos e os parazitos hematicos intra-globulares, foi primeiro revelada, em 1904, pelas memoraveis pesquizas de Schaudinn sobre o ciclo evolutivo do *Haemoproteus noctuae* e do *Leucocytozoon ziemanni*. Nellas o grande pesquizador demonstrou, no organismo do vertebrado, para o *Haemoproteus*, a alternancia de fazes de repouzo intraglobulares, aflajeladas, com a de flajelados livres no plasma. No *Culex pipiens*, de uma fecundação oogamica entre elementos sexuados tipicamente halteridicos, rezultaria um ooquineto, cuja evolução conduziria a parazitos flajelados. No *Leucozytozoon ziemanni* o ooquineto daria logar, por divizão multipla, á formação de organismos espiroquetiformes, com morfolojia de todo ponto identica á dos tripanozomos tipicos.

Inumeras vezes contestadas, sem que, entretanto, a auzencia de verdade nella tenha sido até agóra demonstrada, de modo seguro, as observações de Schaudinn patentearam o estreito parentesco entre os tripanozomos e o grupo de protozoarios hematicos, até então autonomo e que parecia bem delimitado, dos denominados hemosporidios.

O fundo de verdade daquellas observações veiu, bem depressa, revelar-se em outras pesquizas, nas quais protozoarios intracelu-

dem Blute der ersten Patienten zwei Meerschweinchen und eine *Callithrix*, wobei erstere nach wenigen Tagen starben, während der Affe noch zwei Monate lebte und im Zustande grosser Abmagerung und bedeutender Hypoglobulie zu Grunde ging. Mit dem Blute der *Callithrix* impfte ich sechs Meerschweinchen, welche nach 15 Tagen im peripheren Blute Parasiten aufwiesen und innerhalb eines Monates starben. Mit dem Blute dieser Meerschweinchen impfte ich andere, welche die Parasiten erst viel später — 20 bis 30 Tage nachher — im peripheren Blute zeigten. Sie lebten mehr als zwei Monate und starben nach verschiedener Zeit, wobei fast alle Schizogonieformen in den Lungen aufwiesen. Bei dieser Versuchsreihe beobachtete man also eine primäre Virulenzverminderung nach der Passage durch die *Callithrix*, indem der vom Menschen stammende Parasit, der ursprünglich Meerschweinchen in 5 Tage tötete, dies nun erst nach einem Monate oder nur wenig früher tat. Eine zweite, noch intensivere Abschwächung erlitt das Virus im Organismus der Meerschweinchen, wie der Erfolg der Weiterimpfungen zeigt, welche den Tod der Tiere erst nach mehr wie 2 Monaten zur Folge hatten.

Die grosse Virulenz des menschlichen Parasiten für Meerschweinchen zeigte sich wieder bei der Uebertragung des Blutes von dem Patienten Jose auf zwei dieser Tiere, welche nach wenigen Tagen starben. Bei einem dritten Versuche, in welchem ein Meerschweinchen infiziert wurde und mehr wie einen Monat am Leben blieb, war die Menge des übertragenen Blutes weniger als $^1/_2$ cc, während ich von den beiden ersten Kranken je 1 bis 2 cc. in die Bauchhöhle der Meerschweinchen einspritzte.

Es muss hier die verschiedene Intensität der Infektion bei den einzelnen Patienten betont werden, welche es unmöglich macht, aus diesen Resultaten endgültige Schlüsse auf die Virulenz der Parasiten zu ziehen. So waren bei den ersten Patienten schon bei flüchtiger Untersuchung Parasiten im peripheren Blute nachzuweisen, während bei den anderen die Infektion nur durch Einimpfung empfindlicher Tiere nachgewiesen werden konnte.

lares aflajelados mostraram, nas culturas artificiais, fórmas flajeladas com aspeto morfolojico das critidias. Assim MYAJIMA obteve, nas culturas de piroplasma, fórmas de flajelados que o pesquizador supõe serem fazes evolutivas daquelle parazito. O mesmo rezulta das pesquizas de ROGERS e CH. NICOLLE, com a *Leishmania,* que daria, nas culturas, fórmas flajeladas bem carateristicas.

Por outro lado, os metodos modernos de citolojia dos protozoarios vieram ainda, *maxime* nos trabalhos de HARTMANN e PROWAZEK, revelar um outro carater comum aos dois grupos de parazitos, hemosporidios e tripanozómidas. Referimo-nos a dualidade nuclear, bem nitida nos generos *Trypanosoma, Crithidia* e *Herpetomonas,* sendo aí o segundo nucleo, o locomotor, reprezentado pelo blefaroplasto.

Nos hemosporidios, algumas vezes, aspeto morfolojico analogo ao dos tripanozomos é encontrado numa faze qualquer do ciclo evolutivo, confórme verificaram SCHAUDINN, nos merozoitos e esporozoitos da malaria, e HARTMANN, naquelles e no microgámeta do proteozoma.

Quando assim não é, na auzencia de qualquer aparelho flajelar, não raro é possivel verificar a dualidade de nucleos, mesmo em fórmas de repouzo intraglobulares. E' o que acontece nas hemogregarineas (V. PROWAZEK) no esporozoito da malaria (ED. e ET. SERGENT), na *Lankesterella ranarum* (FRANÇA, BILLET e BRUMPT) no *Halteridium* (HARTMANN e WOODCOCK), no *Piroplasma bigeminum* etc. Ainda assim a autonomia e a delimitação dos hemosporidios, delles com os flajelados incluidos na antiga familia de tripanozomidas, parecia ter baze solida em condições biolojicas carateristicas, como fossem a multiplicação por meio de fórmas esquizogonicas regulares e a constancia do parazitismo intra-celular. Estas duas condições, aliaz, acham-se ligadas por uma relação de dependencia, sendo a multiplicação esquizogonica, provavelmente, consequencia do parazitismo intra-celular (HARTMANN). Nem faltam aqui, no processo de multiplicação, fórmas de aproximação entre os tripanozó-

Verlauf der Krankheit bei Meerschweinchen und Callithrix.

Der Verlauf der Infektion mit *Schizotrypanum cruzi* bei Versuchstieren hängt besonders von der Herkunft des Parasiten ab. Als Regel gilt der rasche Tod der Tiere — nicht selten mit wenigen oder ganz fehlenden Parasiten im peripherischen Blute — bei der Infektion durch Conorhinen. Bei derselben Tierart kann jedoch bei späteren Uebertragungen das Leben länger erhalten bleiben und zwar bis zu 2 Monaten und länger bei Meerschweinchen und *Callithrix.* In solchen Fällen gibt es Perioden, in welchen die Parasiten im peripheren Blute zahlreicher erscheinen. Bei einigen Tieren beobachtete ich rasches Verschwinden der Parasiten von der Peripherie, was an die Krisen erinnert, welche bei Spirochätosen beobachtet werden. Eine andere, häufig wiederholte, Beobachtung betrifft den Tod der Tiere in einer Periode aktiver Schizogonie des Parasiten. Die Meerschweinchen zeigen in diesem Falle die Lungenkapillaren voll von Schizogonieformen, während gleichzeitig die Flagellaten im peripheren Blute abnehmen oder ganz fehlen.

Von Krankheitssymptomen, welche bei Versuchstieren beobachtet werden, müssen — neben Temperatursteigerungen, starker Abmagerung und Hypoglobulie — allgemeine, manchmal sehr beträchtliche Lymphdrüsenanschwellungen und Augenaffektionen, besonders Keratitis hervorgehoben werden. Letztere ist bei der *Callithrix* besonders häufig und bedingt nicht selten vollständigen Verlust des Sehvermögens. Endlich erwähne ich den häufig beobachteten Tod des Tieres unter Konvulsionen.

Allgemeine Betrachtungen.

1. KLASSIFIKATION.

Das Bestehen engerer phylogenetischer Beziehungen zwischen den Trypanosomen und den intraglobulären Blutparasiten wurde zuerst 1904 durch die denkwürdigen Forschungen aufgedeckt, welche SCHAUDINN über den Entwicklungszyklus des *Haemoproteus noctuae* und *Leukocytozoon Ziemanni* machte. In diesen

midas e os hemosporidios. Assim temos como aperfeiçoamento á cizão binaria do *Trypanosoma brucei* e de outras especies, a cizão multipla do *Trypanosoma lewisi,* nos orgãos internos com aspeto de rozaceas, cujas unidades são em numero variavel; e tambem no *Trypanosoma rotatorium,* no sangue periferico, a divizão em 4 ou mais unidades, realizada em organismos arredondados (observação inedita no Instituto de Manguinhos).

Nos hemosporidios, a auzencia de aparelho flajelar, que muitas vezes tem reprezentação parcial no blefaroplasto, significa na opinião de HARTMANN, um fenomeno de redução, dependente da vida intracelular do parazito. Nesse ponto o *Haemoproteus,* pela alternancia de fazes intraglobulares com blefaroplasto e auzencia de flajelo e de fórmas flajeladas no plasma, reprezenta tranzição, bem carateristica, entre os tripanozomos e os hemosporidios.

Estes fatos e outros que não referimos, interpretados em demoradas considerações (*Archiv. für Protistenkunde,* 1908) levaram HARTMANN a modificar a classificação de protozoarios, introduzindo na sub-classe de flejelados a nova ordem de *Binucleata.* Nesta ficam incluidos em diversas familias, os parazitos hematicos que anteriormente formaram o grande grupo dos hemosporidios e os flajelados que, antigamente, formavam a familia dos tripanozomos.

O parazito que estudamos vem trazer a essa modificação da sistematica apoio inabalavel, visto reprezentar, entre os tripanozomos tipicos e os protozoarios incluidos no genero *Plasmodium,* fórma intermediaria bem caraterizada. Nelle, realmente existem condições biolojicas, alternantes nas diversas fazes do ciclo, pertencentes aos 2 grupos de parazitos. Ao em vez da cizão binaria, encontrada na maioria de tripanozomos ou da divizão multipla irregular do *Trypanosoma lewisi* temos aqui multiplicação por esquizogonia tipica e constante, sempre constituida do mesmo numero de individuos. Este processo mais aperfeiçoado de multiplicação se relaciona com a faze intracelular do parazito.

zeigte der hervorragende Forscher für *Haemoproteus,* dass im Organismus der Wirbeltiere ein Wechsel von intraglobulären, geisselosen Ruheformen mit frei im Plasma lebenden Flagellaten besteht. Aus einer oogamen Befruchtung von Geschlechtselementen mit typischen Halteridienformen entsteht im *Culex pipiens* ein Ookinet, dessen weitere Entwicklung zu geisseltragenden Parasiten führt. Bei *Leucocytozoon Ziemanni* erzeugte der Ookinet durch multiple Teilung Organismen von Spirochätenform mit einer derjenigen von typischen Trypanosomen vollständig gleichen Morphologie.

Sehr häufig bestritten, ohne dass ihre Unrichtigkeit bisher bestimmt erwiesen wäre, zeigten die Beobachtungen von SCHAUDINN die enge Verwandschaft zwischen den Trypanosomen und der Gruppe von Protozoen des Blutes, die bisher als, scheinbar gut umschriebene, selbständige Gruppe unter den Namen *Haemosporidien* vereinigt wurden.

Das tatsächlich Richtige in diesen Beobachtungen wurde bald durch andere Forschungen erwiesen, nach welchen intracelluläre, geisselose Protozoen in künstlichen Kulturen geisseltragende Entwicklungsstadien von *Leptomonas*-Form zeigten. So erhielt MIAJIMA in Kulturen von Piroplasmen Flagellatenformen, welche dieser Forscher für Entwicklungsstadien des Parasiten hielt. Ebenso ergibt sich aus den Untersuchungen von ROGERS, LEISHMAN und Ch. NICOLLE über *Leishmania* das Auftreten von gut charakterisierten geisseltragenden Formen.

Auf anderer Seite erwiesen die neuen cytologischen Methoden, besonders in den Arbeiten von HARTMANN und v. PROWAZEK, ein neues Charakteristikum, welches beiden Parasitengruppen, den *Haemosporidien* und *Trypanosomiden* gemein ist.

Es ist dies die Zweizahl der Kerne, welche deutlich bei den Gattungen *Trypanosoma, Crithidia, Leptomonas* und *Herpetomonas* hervortritt, bei welchen der zweite lokomotorische Kern durch den Blepharoplasten vertreten ist.

Bei den Haemosporidien finden sich manchmal denjenigen von Trypanosomen analoge Bildungen in irgend einer Phase des Entwicklungskreises, wie SCHAUDINN bei dem Mero-

Na evolução no sangue aprezenta o parazito uma primeira faze intraglobular, na qual os organismos iniciais, aflajelados, ~~que~~, óra, mostram nucleo unico, achando-se nestes o blefaroplasto incorporado ao nucleo principal, óra são vistos já com dualismo nuclear. A' faze intraglobular, na qual tem logar, de regra, a formação do aparelho flajelar completo, segue-se outra de flajelados livres no plasma, na qual a morfolojia do parazito é inteiramente semelhante á dos tripanozomos. Em rezumo: processo de multiplicação por esquizogonia e parazitismo intracelular, de um lado, do outro, vida livre no plasma, com organização estrutural analoga á de qualquer especie do genero tripanozomo, constituem dois aspetos biolojicos, reunidos no mesmo parazito, que caraterizam grupos de protozoarios distanciados nas classificações anteriores — hemosporidios e tripanozomos, reunidos agóra na mesma ordem dos *Binucleata,* pela sistematica de HARTMANN.

Julgámos ainda que o processo de multiplicação por esquizogonia, com auzencia de divizão lonjitudinal binaria, aliado á faze intraglobular, deve determinar a creação de um novo genero, na familia *Trypanosomidae,* porquanto nenhum tripanozomo conhecido aprezenta, reunidos, aquellas condições biolojicas. Além de que, as grandes dimensões do blefaroplasto deste flajelado, constituem carateristica morfolojia que bem o distancia das especies conhecidas.

MESNIL e BRIMONT, para um parazito intraglobular do *Cholopus didactylus,* crearam o genero *Endotrypanum,* em virtude do aspeto morfolojico, proximo do dos tripanozomos e da vida intracelular. Não surpreenderam qualquer fórma livre do parazito e nem conhecem ontra faze de evolução. Não seria aceitavel, só pela condição de vida intraglobular comum, colocar nosso flajelado nesse genero, porquanto delle conhecemos caracteristicas biolojicas que mais autorizam a creação de genero novo. E só na hipoteze de ser verificado, para o parazito de MESNIL, uma faze flajelada livre no plasma e a multiplicação esquizogonica, deverá o genero *En-*

und Sporozoiten der Malaria und HARTMANN bei denselben und den Microgameten von *Proteosoma* feststellte. Selbst beim Fehlen jedes Geisselapparates lassen sich, nicht selten sogar bei intraglobulären Ruhezuständen, doppelte Kerne erkennen. Dies geschieht bei den Haemogregarinen (V. PROWAZEK), bei den Sporozoiten der Malaria (ED. und ET. SERGENT), bei *Lankesterella ranarum* (FRANÇA, BILLET und BRUMPT), bei *Halteridium* (BERLINER und WOODCOCK), bei *Piroplasma bigeminum* (BREINL) u. s. w. Trotzdem schien die Autonomie der Haemosporidien und ihre Abgrenzung von den zur früheren Familie der Trypanosomen gehörigen Flagellaten in biologischen Ckarakteren festbegründet; es sind dies die Vermehrung durch regelmässige Schizogonie und der beständige intracelluläre Parasitismus. Diese Charaktere stehen übrigens nach HARTMANN in einem Abhängigkeitsverhältniss, indem die Vermehrung durch Schizogonie wahrscheinlich eine Folge des Zellparasitismus ist. Es finden sich aber auch bei dieser Vermehrungsweise Annäherungen zwischen Trypanosomiden und Haemosporidien. So haben wir als eine Weiterführung der Zweiteilung des *Trypanosoma brucei* und anderer Arten die multiple Teilung des *Trypanosoma lewisi* in den inneren Organen, in Form von Rosetten, deren Individuenzahl wechselt, ebenso bei *Trypanosoma rotatorium* im peripherischen Blute einen Zerfall in vier oder mehr Individuen nach Abrundung des Organismus (unveröffentlichte Beobachtung aus dem Institute von *Manguinhos*).

Bei den Haemosporidien bedeutet die Abwesenheit eines Geisselapparates, der häufig durch den Blepharoplasten teilweise repräsentiert wird, nach der Ansicht von HARTMANN ein Reduktionsphänomen als Folge der intracellulären Lebensweise der Parasiten. In dieser Hinsicht bildet *Haemoproteus* durch den Wechsel intraglobulärer Phasen (mit Blepharoplast, aber ohne Geissel) und geisseltragender Plasmaformen einen ausgesprochenen Uebergang von *Trypanosomen* zu *Haemosporidien.*

Diese und andere, hier nicht aufgeführte Tatsachen, welche er im Archiv für Protisten-

dotrypanum ser preferido ao que adotamos para nosso parazito.

O *Endotrypanum Schaudinni* binucleado intraglobular, é, com muita lojica, considerado pelos autores como fórma intermediaria entre os tripanozomos o os hemosporidios, constituindo tambem pela morfolojia e pelo parazitismo intracelular, um poderozo argumento em favor das idéas de SCHAUDINN sobre as estreitas relações filojeneticas entre os tripanozomos e o antigo grupo de hemosporidios.

II. DIMORFISMO SEXUAL.

A existencia nos tripanozomos, de diferenciações morfolojicas, ligadas á dualidade sexual, permanece ainda, apezar de numerozas pesquizas sobre o assunto, objeto de opiniões diverjentes. Foram os trabalhos de SCHAUDINN, que dispertaram a atenção dos pesquizadores para a existencia de diferenças sexuais, no inicio do ciclo evolutivo destes flajelados no organismo do inséto transmissor. No halteridio, porém, o diferente aspeto morfolojico dos gametos, sexualmente bem caraterizados, não oferece marjem á discussão.

Nos tripanozomos, quem primeiro rejistrou a dualidade de sexos foi V. PROWAZEK no *Trypanosoma lewisi.* Aqui, no estomago do *Haematopinus spinulosus,* a morfolojia do flajelado sofre modificações notaveis, que mais acentuam o diformismo do parazito, já existente no sangue do rato, e que corresponde á dualidade de sexos. V. PROWAZEK admite 2 sexos, considerando ainda duvidoza a existencia das fórmas indiferentes. MINCHIN, em longas pesquizas sobre o *Trypanosoma gambiense,* tambem conclue pela existencia de dois aspetos morfolojicos do tripanozomo no sangue do vertebrado, verificando ainda a permanencia desse dimorfismo, na faze inicial da evolução no tubo dijestivo da *Glossina palpalis.*

Diverjentes são as concluzões de BREINL e MOORE em diversas especies de tripanozomos: *gambiense, equiperdum, lewisi.* Para esses autores, si algum fenomeno de fecundação ocorre nos tripanozomos, consistiria elle em uma ação do blefaroplasto sobre o nucleo

kunde (1908) eingehend auseinandersetzte, bewogen HARTMANN, die Klassifikation der Protozoen abzuändern, indem er in die Unterklasse der Flagellaten die neue Ordnung der *Binucleaten* einreihte. Diese umfasst in verschiedenen Familien die Blutparasiten, welche früher die grosse Gruppe der *Haemosporidien* bildeten, nebst den Flagellaten, welche früher in die Familie der *Trypanosomen* gestellt wurden.

Der hier studierte Parasit bringt für diese Modifikation der Systematik eine feste Stütze, indem er eine deutliche Uebergangsform zwischen den typischen *Trypanosomen* und dem Genus *Plasmodium* bildet. In der Tat finden sich hier in den verschiedenen Entwicklungsphasen abwechselnd biologische Zustände, welche beiden Parasitengruppen angehören. An Stelle der Zweiteilung, wie sie bei der Mehrzahl der *Trypanosomen* vorkommt und der unregelmässigen multiplen Teilung des *Trypanosoma lewisi* haben wir hier eine Vermehrung durch typische und konstante Schizogonie, bei welcher stets eine bestimmte Zahl gleichartiger Individuen gebildet wird. Diese höchste Vervollkommnung des Vermehrungsprozesses steht in Beziehung zu einer intracellulären Phase der Parasiten. Bei seiner Entwicklung im Blute zeigt derselbe zuerst eine intraglobuläre Phase von geissellosen Organismen, welche bald einen einzigen den Blepharoplast einschliessenden Kern zeigen, bald einen doppelten Kern aufweisen. Auf eine intraglobuläre Phase mit — gewöhnlich vollständigem — Geisselapparat folgt eine andere im Plasma, welche morphologisch völlig den Trypanosomen gleicht. Es bilden also auf einer Seite Vermehrung durch Schizogonie und intracellulären Parasitismus, auf der anderen freies Leben im Plasma mit einer Struktur, welche einer beliebigen Art des Genus *Trypanosoma* entspricht, bei einem und demselben Parasiten zwei biologische Erscheinungsformen, welche sonst für zwei Protozoengruppen (*Haemosporidien* und *Trypanosomen*) charakteristisch sind; diese, in früheren Klassificationen getrennt, werden jetzt durch die Einteilung von HARTMANN in derselben Ordnung der *Binucleaten* vereinigt.

principal, realizada pela imigração de parte da substancia do primeiro para o interior do segundo. Este fenomeno reprezentaria fato capital do ciclo do parazito no organismo do vertebrado.

BREINL e MOORE consideram a diversidade morfolojica dos tripanozomos no sangue como exprimindo estadios consecutivos de crecimento do flajelado, não encontrando, em qualquer das especies que estudaram, indicação alguma para a teoria do dimorfismo sexual.

Vejamos o que rezulta de nossas observações:

O dualismo morfolojico do *Schizotrypanum cruzi* aprezenta-se muito nitido em todas as fazes do ciclo, tanto no vertebrado como no inséto transmissor. São diferenças fundamentais de estrutura, especialmente acentuadas nos aspetos da cromatina do nucleo principal e do blefaroplasto, sendo inaceitavel querer fazel-as dependentes do crecimento, quando prezentes em dois organismos no mesmo estadio evolutivo. Assim é que nos merozoitos das fórmas esquizogonicas do pulmão, um dos organismos, que devemos considerar merozoito femeo mostra, desde logo, o blefaroplasto distinto do nucleo principal e neste o cariozoma muito menor que nos organismos considerados machos, nos quais, neste estadio, a substancia do blefaroplasto ainda se acha confundida com a do nucleo principal.

Nas fórmas intraglobulares e nos flajelados livres no plasma o mesmo diformismo se evidencia, espressando-se, como descrevemos, não só nas dimensões do plasma, carater secundario, mas ainda na estrutura do blefaroplasto, que num dos cazos é munido de pequeno cariozoma esferico e no outro possue cariozoma maior, ovoide quazi sempre, transversalmente colocado. Na estrutura do nucleo existe a mesma dualidade de aspeto, sendo de rejistrar a menor quantidade de substancia cromatica na fórma que consideramos femea. Os organismos jovens, cujos nucleos se aprezentam com a cromatina disposta em longa faixa lonjitudinal, bem caraterizam esse diformismo.

Ich bin, wie schon eingangs erwähnt, der Ansicht, dass die Vermehrung durch Schizogonie, bei Fehlen einer einfachen Längsteilung, in Verbindung mit der intraglobulären Entwicklungsphase die Aufstellung eines neuen Genus in der Familie *Trypanosomidae* nötig macht, da kein bekanntes *Trypanosoma* die Vereinigung dieser beiden Zustände aufweist. Ausserdem liegt in den grossen Dimensionen des Blepharoplastes dieses Flagellaten ein morphologisches Kennzeichen, welches ihn von den früher bekannten Arten trennt.

MESNIL und BRIMONT bildeten für einen intraglobulären Parasiten des *Coloepus didactylus* ein neues Genus *Endotrypanum*, auf Grund der morphologischen Aehnlichkeit mit den Trypanosomen und der intracellulären Lebensweise. Sie trafen keine freie Form des Parasiten und kennen auch keinen anderen Entwicklungszustand. Es geht vorläufig nicht an — nur wegen des gemeinsamen Kennzeichens des intraglobulären Vorkommens — unseren Flagellaten jenem Genus einzureihen, da von demselben biologische Charaktere bekannt sind, welche die Aufstellung einer neuen Gattung begründen. Nur im Falle, dass beim MESNIL'schen Parasiten eine freie geisseltragende Blutform und eine Vermehrung durch Schizogonie nachgewiesen würden, müsste das Genus *Endotrypanum* dem von mir gewählten *Schizotrypanum* vorgezogen werden.

Das *Endotrypanum schaudinni* wird als intraglobulärer *Binucleate* mit vollem Recht von den Autoren als eine Uebergangsform von *Trypanosoma* zu den *Haemosporidien* angesehen; durch seine Morphologie und seinen intracellulären Parasitismus bildet es ebenfalls einen wichtigen Beweis zu Gunsten der Ideen von SCHAUDINN über die engen phylogenetischen Beziehungen zwischen den *Trypanosomen* und der bisherigen Gruppe der *Haemosporidien.*

2. SEXUELLER DIMORPHISMUS.

Trotz mannigfacher Untersuchungen über diese Frage bildet das Vorkommen verschiedener Trypanosomenformen als Ausdruck einer sexuellen Dualität noch immer den Gegenstand divergierender Ansichten. Durch die

No organismo do *Conorhinus* a dualidade morfolojica mais notavel é encontrada nas 2 fórmas das glandulas salivares, sendo uma dellas estreita, munida de grande blefaroplasto e aprezentando nucleo longo, disposto segundo o eixo lonjitudinal do parazito; a outra, de plasma mais largo, mostra menor blefaroplasto na extremidade posterior.

Não podemos, é claro, dos fatos observados nesse parazito, tirar concluzões gerais seguramente aplicaveis ás especies do genero tripanozomo; certo, porém, os fenomenos biolojicos aqui verificados não pódem estar muito distantes dos analogos, ainda mal estudados, nos tripanozômos tipicos.

III. O Schizotrypanum cruzi no organismo do hemiptero transmissor.

As pesquizas fundamentais sobre a intervenção das moscas hematofagas, na etiolojia das tripanozomiazes dos grandes mamiferos, foram realizadas por Bruce, em memoraveis trabalhos sobre o nagana. Já antes, viajantes em certas rejiões da Africa e tambem os indijenas conheciam o efeito malefico das picadas da mosca tse-tse; coube, porém, a Bruce demonstrar experimentalmente a transmissão do parazito do nagana, *Trypanosoma brucei* pela *Glossina morsitans*.

Foi assim iniciado novo capitulo na historia dos tripanozômos e aberta a via para numerozas pesquizas sobre esse assunto, do qual pontos importantes têm escapado, até agóra, ao dezejado esclarecimento.

A transmissão do plasmodio e do proteozoma pelos culícidas indicava serem provaveis fenomenos evolutivos analogos nos tripanozomos. Desde as pesquizas de Bruce, porém, aquella opinião foi abandonada, sendo substituida pela hipoteze da transmissão do parazito ajindo os dipteros como simples veiculadores sem qualquer função biolojica especifica. A' tal concluzão levou o fato de ter Bruce verificado que a *Glossina morsitans* só era transmissora dentro das primeiras 48 óras apoz a picada contaminante; observações recentes, porém, talvez mais exatas, vieram modificar a noção adquirida.

Arbeiten von Schaudinn wurde zuerst die Aufmerksamkeit der Forscher auf das Vorkommen sexueller Unterschiede bei *Haemoproteus* zu Anfang seines Entwicklungszyclus im Darme des Ueberträgers gerichtet. Beim *Halteridium* dagegen gestattet das verschiedene morphologische Bild der Gameten, welche deutlich zwei Geschlechtern entsprechen, keine weitere Diskussion.

Unter den *Trypanosomen* wurde die Zweigeschlechtlichkeit zuerst von Prowazek bei *Trypanosoma lewisi* angegeben. Bei diesem erleidet die Gestalt des Flagellaten im Magen des *Haematopinus spinulosus* deutliche Veränderungen, durch welche der Dimorphismus, der schon beim Blutparasiten der Ratte erkennbar ist und der Zweizahl der Geschlechter entspricht, noch deutlicher wird. V. Prowazek erkennt zwei Geschlechter an, während er das Vorkommen indifferenter Formen als noch zweifelhaft ansieht. Bei seinen eingehenden Untersuchungen über *Trypanosoma gambiense* gibt Minchin ebenfalls das Vorkommen zweier verschiedener Formen des Trypanosoma im Blute zu und konstatiert auch das Fortdauern dieses Dimorphismus im Anfange der Entwicklung im Darmkanale der *Glossina palpalis*.

Dagegen kommen Breindl und Moore in Beziehung auf *Trypanosoma gambiense, equiperdum* und *lewisi* zu entgegengesetzten Schlüssen; nach ihnen können Befruchtungserscheinungen, wenn sie bei Trypanosomen vorkommen, nur in einer Einwirkung des Blepharoplasts auf den Hauptkern bestehen, welche in der Einwanderung eines Teils der Substanz des ersteren ins Innere des zweiten bestünde. Diese Erscheinung bilde einen wichtigen Akt in der Entwicklungsreihe des Trypanosoma der Wirbeltiere.

Breinl und Moore sehen in der Verschiedenheit der Bluttrypanosomen nur den Ausdruck aufeinander folgender Wachstumsphasen, indem sie bei keiner der — von ihnen studierten — Arten Anzeichen eines sexuellen Dimorphismus auffanden. — Sehen wir nun, was aus meinen Beobachtungen hervorgeht:

Der morphologische Dualismus des *Schizotrypanum cruzi* zeigt sich sehr deutlich in allen Entwicklungsphasen, sowohl beim Wir-

O descobrimento do tripanozômo da molestia do sono determinou tambem, pela maior importancia do assunto, visto tratar-se de molestia humana, numerozas investigações. Dellas vão rezultando, todos os dias, novos conhecimentos, sendo de esperar, seja brevemente rezolvido o importante problema.

Coube a BRUCE e CASTELLANI verificar experimentalmente o papel transmissor da *Glossina palpalis,* repetindo-se aqui fato similar ao da transmissão do nagana, pela *Glossina morsitans,* limitado o periodo infetante do diptero ás primeiras 48 hóras apoz a picada contaminante.

Outros fatos, especialmente a prezença de tripanozomos no organismo de glossinas recem-capturadas, cujo tubo dijestivo se aprezentava vazio de sangue, lavaram alguns pesquizadores a admitir um ciclo evolutivo do flajelado no diptero transmissor.

Foram assim as observações de KOCH a respeito do *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma gambiense* no tubo dijestivo de glossinas. Nestas KOCH distinguiu diferenciações de fórmas que julgava ligadas á diversidade de sexos. Experimentando ainda com o *Trypanosoma gambiense,* KOCH verificou estádios nas glossinas *fusca* e *tachinoides,* de 10 a 20 dias apoz a refeição contaminante.

Similares rezultados deram as pesquizas de STUHLMANN e KUDICKE sobre o *Trypanosoma brucei* na *Glossina fusca.* Para estes autores a evolução do parazito teria inicio pela multiplicação das fórmas indiferentes no intestino posterior, caminhando o tripanozomo dali para o intestino anterior, aonde teria lugar a fecundação e formação dos pequenos parazitos inoculaveis ao vertebrado. O estádio ultimo, porém, com parazitos na cavidade da tromba, só seria atinjido em 10 % das glossinas em experiencia.

Os trabalhos de MINCHIN, GRAY e TULLOCH deram rezultados muito interessantes. Verificaram na *Glossina palpalis,* estádios evolutivos do *Trypanosoma gambiense,* até o 4.º dia apoz a injestão contaminante, sendo a evolução, no *proctodœum,* pela diferenciação morfica do parazito em 2 tipos, interpretados pelos autores como sexos diferentes. Apoz

beltiere, als auch beim übertragenden Insekte. Es handelt sich um fundamentale Strukturdifferenzen, die sich besonders in der Form des Chromatins am Hauptkern und Blepharoplast aussprechen und sich nicht durch das Wachstum erklären lassen, da sie bei beiden Organismen im selben Entwicklungszustande vorkommen. So zeigt bei den Merozoiten der Schizogonieformen aus der Lunge einer derselben, den wir als weiblich ansehen, gleich zu Anfang den Blepharoplast vom Hauptkerne getrennt und in diesem ein viel kleineres Caryosom als bei den Formen, die ich für männliche halte; bei letzteren findet sich in dieser Phase die Substanz des Blepharoplasts noch mit derjenigen des Hauptkernes vereinigt. Auch bei den intraglobulären Formen und den freien Flagellaten im Plasma ist derselbe Dimorphismus deutlich erkennbar; er äussert sich, wie beschrieben, nicht nur in den mehr nebensächlichen, grösseren Verhältnissen des Plasma, sondern auch in der Struktur des Blepharoplasts, welcher in einem Falle ein kleines rundes — im anderen Falle ein grösseres, eiförmiges und fast stets quergelagertes Caryosom aufweist. Auch bei der Struktur des Kernes findet sich dieselbe Duplizität der Bildung, wobei die geringere Chromatinmenge bei einen, der als weiblich aufgefassten, Form hervorzuheben ist. Die jugendlichen Formen, deren Kerne das Chromatin in Form eines langen und längs gelagerten Bandes zeigen, lassen diesen Dimorphismus deutlich erkennen.

Im Organismus des *Conorhinus* zeigt sich die morphologische Dualität am deutlichsten bei den zwei Formen aus den Speicheldrüsen, indem die eine schmale einen grossen Blepharoplast und einen langen Kern aufweist, welcher der Längsachse des Parasiten entsprechend gelagert ist, während der andere, mit breiterem Plasmakörper am Hinterende, einen kleineren Blepharoplasten zeigt.

Ich kann natürlich aus den bei diesen Parasiten beobachteten Tatsachen keine allgemeinen Schlüsse ziehen, welche sich mit Sicherheit auf die Arten des Genus *Trypanosoma* anwenden liessen; doch können die in meinem Falle sehr deutlich beobachteten bio-

o 4.º dia, raramente depois do 5.º, os flajelados dezapareceriam do intestino, não sendo encontrados em qualquer dos orgãos da glossina. Em experiencias com *Stomoxys, Taeniorhincus* e outros dipteros, verificaram os pesquizadores fatos analogos, com mais rapido dezaparecimento dos flajelados.

Nas tentativas de transmissão os rezultados destes experimentadores não trazem ao assunto concluzões gerais decizivas. Só conseguiram infetar novos animais, fazendo-os picar pelas glossinas imediatamente apoz a injestão contaminante. MINCHIN, argumentando com as proprias observações e com as de outros pesquizadores, conclue pela existencia de ciclos evolutivos dos tripanozômos em hospedeiros especificos, não sendo a *Glossina palpalis* o transmissor natural do *Trypanosoma gambiense,* papel incumbido á *Glossina fusca,* segundo as experiencias de KOCH.

De interesse foi ainda nesses trabalhos, a verificação da prezença de 2 tripanozômos no tubo dijestivo das glossinas em liberdade, *Trypanosoma grevi* e *T. tullochi,* muitas vezes confundidos, pelos pesquizadores, com estádios evolutivos dos tripanozômos dos grandes mamiferos e do *Trypanosoma gambiense.*

As investigações referidas, indicando seguramente o papel transmissor das moscas, falavam mais em favor da simples veiculação do flajelado pelo diptero. Realmente, nas tentativas de transmissão experimental, a função infetante do inséto só era exercida num pequeno espaço de tempo apoz a picada contaminante, o que parecia indicar a auzencia do ciclo evolutivo. Outras observações, porém, vinham contradizer as que referimos, mostrando a deficiencia dos conhecimentos nellas adquiridos. De fato, das investigações de BRUMPT, LÉGER, BILLET e KEYSSELITZ rezulta o dezenvolvimento dos tripanozomos dos peixes e das rãs no organismo de hirudineos, só evoluindo certas especies de tripanozomos em determinadas sanguesugas, o que indicava a necessidade de condições biolojicas especiais.

Por outro lado, trabalhos fundamentais de SCHAUDINN sobre o *Haemoproteus* e os de v. logischen Erscheinungen nicht sehr verschieden sein von den entsprechenden, aber noch wenig erforschten, die bei typischen Trypanosomen vorkommen.

III. Das Schizotrypanum im Organismus des Conorhinus.

Die grundlegenden Forschungen über die vermittelnde Rolle blutsaugender Fliegen bei Trypanosomainfektionen wurden von BRUCE in seinen wertvollen Arbeiten über *Nagana* gemacht. Schon frühere Reisende in gewissen Gegenden Afrikas kannten ebensowohl, wie die Eingeborenen, die verderbliche Wirkung des Stiches der Tsetsefliegen, aber BRUCE zeigte zuerst durch Versuche die Uebertragung des Naganaparasiten, des *Trypanosoma brucei* durch die *Glossina morsitans.* So begann ein neues Kapitel in der Geschichte der Trypanosomen und es öffnete sich die Bahn für zahlreiche neue Untersuchungen über diesen Gegenstand; doch hat sich noch mancher wichtige Punkt der erwünschten Aufklärung entzogen. Die Entwicklungsgeschichte von *Plasmodium* und *Proteosoma* bei den Mücken deutete die Wahrscheinlichkeit ähnlicher Entwicklungsphasen bei Trypanosomen an. Doch wurde diese Ansicht seit den Arbeiten von BRUCE verlassen und durch die Annahme ersetzt, dass die Fliegen bei der Infektion rein mechanische Ueberträger darstellten. Zu diesem Schlusse führte die Beobachtung von BRUCE, dass *Glossina morsitans* nur in den ersten 48 Stunden nach ihrer Infektion (durch Stechen eines kranken Tieres) die Krankheit übertrug, was indessen nach neueren und wohl genaueren Untersuchungen nicht zutrifft.

Auch die Entdeckung des *Trypanosoma* der Schlafkrankheit führte infolge der grossen Wichtigkeit des Gegenstandes — handelte es sich doch um eine Erkrankung des Menschen — zu zahlreichen Forschungen, die täglich unsere Kenntnisse erweitern, so dass man eine baldige Lösung dieses wichtigen Problemes erwarten kann.

BRUCE und CASTELLANI war es vergönnt, die vermittelnde Rolle der *Glossina palpalis* festzustellen, wobei sich die bei der *Nagana*

PROWAZEK sobre o *Trypanosoma lewisi,* revelavam a existencia de ciclos sexuados nos dipteros transmissores.

V. PROWAZEK verificou, no estomago do *Haematopinus spinulosus,* copulação entre individuos de sexos diferentes, com a formação de ooquineto, do qual rezultaria por processos de divizão hetero-polar semelhantes aos descritos por SCHAUDINN, flajelados do tipo critidias.

Os rezultados de v. PROWAZEK foram confirmados nas investigações recentes de BALDREY (*Archiv. fur Protistenkunde,* 1909), destas rezultando mais o fato importante da transmissão do *Trypanosoma lewisi* a um rato indene, por um *Haematopinus,* cuja refeição infetante tivéra lugar 10 dias antes. Nesta verificação de BALDREY rejistra-se um fato de transmissão experimental indireta, apoz estádios evolutivos sistematicamente estudados, ficando aí excluida a veiculação mecanica do flajelado.

Concludentes tambem de um ciclo evolutivo no invertebrado são as recentes experiencias de KLEINE, que verificou a transmissão do *Trypanosoma brucei* pela *Glossina palpalis,* decorrido o prazo minimo de 10 dias, desde a injestão contaminante. Ha que assinalar, nas investigações deste pesquizador, a auzencia do poder infetante do diptero nos primeiros dias depois da picada, fato analogo ao da transmissão do plasmodio e do proteozoma, cuja evolução nos culícidas só se completa apoz determinado tempo. Nas experiencias sobre o *Trypanosoma gambiense* os rezultados de KLEINE são tambem decizivos, verificando o poder infetante das glossinas 20 dias depois de contaminadas, permanecendo infetantes indefinidamente. KLEINE acredita na existencia de faze sexual nos hospedeiros intermediarios, e descreve estádios morficos diversos do parazito, desde o intestino posterior, onde a evolução teria inicio, até as fórmas encontradas na tromba, inoculaveis nos vertebrados.

Os rezultados de E. ROUBAUD, membro da missão de estudos da molestia do sono no Congo francez, registram conhecimentos gemachte Beobachtung wiederholte, indem die Uebertragung sich auf die ersten 24 Stunden nach der infizierenden Blutaufnahme beschränkte.

Neuere Beobachtungen — besonders das Vorkommen von Trypanosomen im Organismus frisch gefangener und kein Blut enthaltender Glossinen — führten andere Forscher zur Annahme eines Entwicklungszyklus des Flagellaten im Ueberträger. So war es bei den Beobachtungen von KOCH über das Verhalten von *Trypanosoma brucei* und *gambiense* im Verdauungstrakte der Glossinen, wobei er Formenunterschiede feststellte, welche er auf einen sexuellen Dimorphismus zurückführte. Indem er weiter mit *Trypanosoma gambiense* experimentierte, fand KOCH 10-20 Tage nach der Aufnahme infektiösen Blutes Entwicklungsstadien bei *Glossina fusca* und *tachinoides.*

STUHLMANN und KUDICKE erhielten ähnliche Resultate bei ihren Untersuchungen über das Verhalten von *Trypanosoma brucei* in der *Glossina fusca.* Nach diesen Autoren beginnt die Entwicklung durch Vermehrung der indifferenten Formen im Hinterdarme, von wo aus sie nach dem vorderen Abschnitte desselben auswandern, woselbst die Befruchtung und Bildung kleiner, auf Wirbeltiere übertragbarer Parasitenformen stattfinden soll. Doch soll das Endstadium — kleine Flagellaten im Innern des Rüssels — nur bei 10 % der benützten Glossinen erreicht werden.

Die Arbeiten von MINCHIN, GRAY und TULLOCH ergaben sehr interessante Resultate. Sie fanden nämlich bei der *Glossina palpalis* Entwicklungsstadien des *Trypanosoma gambiense* bis 4 Tage nach der Aufnahme parasitenhaltigen Blutes, wobei die Entwicklung im Proktodäum mit dem Auftreten zweier Typen begann, welche nach den Autoren verschiedenen Geschlechtern entsprechen. Nach dem vierten, oder nur selten, nach dem fünften Tage verschwanden die Flagellaten aus dem Darme der Glossinen und wurden auch nirgends in den anderen Organen gefunden. Bei Versuchen mit *Stomoxys, Taeniorhynchus* und anderen Zweiflüglern machten sie ähnliche Beobachtungen, wobei indessen die Flagellaten noch rascher verschwanden. Die

novos do mais alto interesse, chegando o autor, sobre alguns pontos do assunto, a concluzões de grande importancia.

Este autor considera 3 modalidades no mecanismo de transmissão dos tripanozomos pelas glossinas:

1. Transmissão direta, imediata, na qual as glossinas ajiriam como lancetas inoculadoras.
2. Transmissão indireta, apoz um periodo de evolução mais demorada, *sem fenomeno sexual;* caminhando nesta o flajelado do intestino posterior, séde de multiplicação ativa, para o *proctodaeum,* e para o canal da tromba.
3. Finalmente, evolução de natureza muito especial, realizada em parazitos morfolojicamente diferenciados, prezos ás paredes internas da tromba.

Nesta ultima modalidade supõe o autor a ocurencia de fenomenos de autogamia, analogos aos descritos nas amebas e em outros protozoarios; delles, porém, não encontrámos, nas descrições, demonstração convincente.

ROUBAUD considera a multiplicação ordinaria dos tripanozomos, verificada no tubo dijestivo de todas as glossinas, alimentadas em animais contaminados, como culturas do parazito, identicas ás obtidas no meio artificial de agar-sangue.

Neste ponto é interessante comparar os rezultados observados com diversas especies de tripanozômos (*brucei, gambiense, dimorphon, congolense, cazalboui,* etc.), verificando-se, assim, que o tempo de permanencia destas especies no tubo dijestivo das moscas é muito variavel, algumas das especies tendo aí pouco tempo de vida, quando outras perduram, em atividade e em multiplicação, até que dezapareçam todos os detritos da dijestão do sangue. De demoradas pesquizas conclue ROUBAUD pela auzencia de migração, das fórmas de cultura, do intestino médio para o anterior e para a tromba, não passando ellas tambem para a cavidade geral ou para qualquer outro orgam da glossina. Assim pois, não serão fórmas que possam infetar, Uebertragungsversuche dieser Autoren gestatten keine entscheidende Schlüsse, da sie Tiere nur dann infizieren konnten, wenn sie dieselben durch Glossinen stechen liessen, welche soeben infektiöses Blut aufgenommen hatten. Gestützt auf eigene und fremde Beobachtungen schliesst MINCHIN auf das Vorkommen eines Entwicklungskreises der Trypanosomen bei specifischen Zwischenwirten. Für das *Trypanosoma gambiensi* wäre die *Glossina palpalis* nicht der natürliche Ueberträger, während diese Rolle nach den Versuchen von KOCH der *Glossina fusca* zufiele.

In diesen Arbeiten interessiert uns noch das Auffinden zweier Trypanosomen (T. GRAYI und T. TULLOCHI) im Darme frisch eingefangener Glossinen, welche von früheren Forschern häufig mit Entwicklungsstadien von *Trypanosoma gambiense* und verschiedenen Arten aus grossen Wirbeltieren verwechselt wurden.

Obgleich die besprochenen Untersuchungen die Rolle der Fliegen als Ueberträger völlig bestätigten, sprachen sie doch mehr zu gunsten einer einfachen mechanischen Uebertragung der Flagellaten. In der Tat beschränkte sich bei den Uebertragungsversuchen die Funktion der Insekten als Krankheitsvermittler auf eine kurze Frist nach dem Stechen eines infizierten Tieres, was das Bestehen eines Entwicklungszyklus auszuschliessen schien. Diesen Beobachtungen wurde jedoch durch andere widersprochen, welche die Mangelhaftigkeit jener Befunde zeigten. So ging aus den Untersuchungen von BRUMPT, LEGER, BILLET und KEYSSELITZ eine Entwicklung von Fisch- und Froschtrypanosomen im Organismus von *Hirudineen* hervor, wobei sich jede Art nur bei bestimmten Blutsaugern entwickelte, was die Notwendigkeit besonderer biologischer Bedingungen beweist. Andererseits zeigten die fundamentalen Arbeiten von SCHAUDINN über *Hämoproteus* und diejenigen von PROWAZEK über *Trypanosoma lewisi* das Vorkommen sexueller Entwicklungsreihen in den übertragenden Insekten. PROWAZEK fand im Magen von *Hämatopinus spinulosus* eine Kopulation zwischen Individuen verschiedenen Geschlechtes mit darauffolgender Bildung eines *Ookineten*, von wel-

por picada, os vertebrados sensiveis. Os aspétos destes flajelados não são semelhantes aos encontrados nas culturas do *Trypanosoma lewisi*, não se verificando os estádios em critidias; acredita o autor ser esse fato peculiar aos tripanozomos patojenicos.

Lembradas essas experiencias, no intuito de estabelecer paralelo entre ellas e os rezultados de nossos trabalhos, devemos referir ainda a opinião diverjente de alguns pesquizadores, especialmente a de NOVY e MAC NEAL, a de BREINL e MOORE, a de PATTON e a de ROSS.

NOVY e MAC NEAL contestaram os trabalhos de SCHAUDINN sobre o Hemoproteo, opinando, a principio, que se tratava de simples cultura de um tripanozomo da *Athene noctuae* no culex; mais tarde, depois da verificação, multiplas vezes repetida, de flajelados no trato inteştinal de insétos, sugadores de sangue ou não, aquelles pesquizadores passaram a interpretar as fórmas flajeladas de SCHAUDINN como sendo parazitos naturais do culex, sem qualquer relação com os hemoparazitos da *Athene noctuae.*

Na infeção natural de hematofagos por flajelados das especies critidia e herpetomonas, NOVY e MAC NEAL encontram a cauza de erro em que supõem incididos outros pesquizadores, descrevendo o dezenvolvimento de tripanozomos de vertebrados no organismo dos insétos.

BREINL e MOORE julgam que o ciclo vital completo de um tripanozomo é realizado no organismo dos vertebrados. Bazea-se essa opinião na prezença de corpos de rezistencia nos orgãos de animais infetados, sendo o aparecimento dellas consecutivo a uma ação do blefaroplasto sobre o nucleo principal. Praa demonstrar ser dispensavel, na evolução dos tripanozomos, uma faze sexuada em invertebrados, lembram o cazo da durina, tripanozomiaze transmitida pelo coito.

PATTON, que tem trazido grande contribuição ao estudo de flajelados do tubo dijestivo de insétos sugadores, acredita que estes exercem, na transmissão dos tripanozomos de vertebrados, o papel simples de veículachem durch eine, der von SCHAUDINN beschriebenen ähnliche, heteropolare Kernteilung Flagellaten von *Crithidia*-typus erzeugt werden.

Die Befunde von PROWAZEK wurden bestätigt durch neuere Untersuchungen von BALDREY (Arch. für Protistenk., 1909); diese ergaben auch die wichtige Tatsache der Uebertragung des *Trypanosoma lewisi* auf normale Ratten durch Läuse, welche 10 Tage vorher infektiöses Blut gesogen hatten. Dieselben Beobachtungen erweisen auch die indirekte experimentelle Uebertragung — nach den systematisch studierten Entwicklungszuständen —, wobei eine mechanische Uebertragung des Flagellaten ausgeschlossen ist.

Auch die neueren Untersuchungen von KLEINE lassen auf einen Entwicklungszyklus beim Ueberträger schliessen; derselbe beobachtete die Uebertragung des *Trypanosoma brucei* durch die *Glossina palpalis* nach einer Minimalzeit von 10 Tagen nach der Aufnahme infektiösen Blutes. Dabei muss auch das Fehlen der Infektiosität der Fliege in den ersten Tagen hervorgehoben werden, in Uebereinstimmung mit der Uebertragung von *Plasmodium* und *Proteosoma*, zu deren vollständiger Entwicklung bei den Mücken eine bestimmte Zeit nötig ist. Auch bei den Versuchen über *Trypanosoma gambiense* waren die Ergebnisse von KLEINE entscheidend; er konstatierte die Infektiosität der Glossinen 20 Tage nach der Blutaufnahme; dieselbe erhielt sich unbeschränkte Zeit. KLEINE glaubt an das Vorkommen sexueller Phasen bei Trypanosomen in den Zwischenwirten und beschreibt verschiedene Parasitenformen, von denjenigen im Hinterdarme — wo die Entwicklung beginnen soll — bis zu den Formen, welche im Rüssel vorkommen und sich auf Wirbeltiere übertragen lassen.

Auch die Versuche von E. ROUBAUD, Mitglied einer Mission zum Studium der Schlafkrankheit im französischen Congo-Gebiete, ergaben wissenschaftliche Resultate von höchstem Interesse. Derselbe erörtert drei Modalitäten des Mechanismus bei der Uebertragung der Trypanosomen durch Glossinen: 1. Direkte, unmittelbare Uebertragung, bei welcher die Glossinen als Inokulationsinstrument die-

dores. Opinião identica é a de Ross, que verificou, nas larvas e ninfas de culícidas, flajelados do genero critidia.

Vamos concluir agóra das nossas investigações:

Experimentando com larvas creadas no laboratorio e tendo excluido a infeção hereditaria de flajelados nellas, nossos rezultados escapam a objeção de ser possivel aqui tratar-se de flajelados naturais do hemiptero. Além de que, larvas testemunhas eram alimentadas em animais normais e nellas nunca encontrámos parazitos.

As experiencias testemunhas tornaram-se necessarias, *maxime* por termos verificado a a prezença de flajelados, no intestino médio, da quazi totalidade de conorrinos, colhidos nas habitações, o que levava a crêr fossem elles parazitos naturais do inséto. Em verdade, não estamos, por emquanto, habilitado a decidir sobre esse ponto, sendo possivel que os conorrinos, transmissores do *Schizotripanum cruzi,* sejam naturalmente parazitados por flajelados do genero critidia. Para explicar a infeção da totalidade de conorrinos por flajelados, admitindo que estes reprezentem sempre estádios evolutivos do *Schizotripanum,* fôra necessario supôr outro módo de contaminação do hemiptero, talvez a infeção das larvas pelos excrementos de hemipteros já infetados (Lutz). Isso, porque a picada de vertebrados contaminados certamente não ocazionaria, com tanta constancia, infeção dos conorrinos. Verdade é que não existe diferença alguma morfolojica, entre os flajelados do tubo dijestivo das larvas infetadas no laboratorio e os dos conorrinos colhidos nas rezidencias humanas. Por outro lado, a inoculação em cobaias do material do intestino de larvas, experimentalmente contaminadas, forneceu-nos diversos rezultados positivos, falhando algumas vezes, o mesmo acontecendo aos flajelados do intestino de insétos recemcapturados. Seja como fôr, embóra devamos voltar a novas pesquizas para esclarecer amplamente a natureza dos flajelados do intestino de conorrinos em liberdade, nossas observações sobre o dezenvolvimento do *Schizotrypanum* acham-se izentas de qualquer

nen. 2. Indirekte Uebertragung nach einer längeren Entwicklungsperiode, aber ohne geschlechtliche Phase, bei welcher der Flagellat — nach aktiver Vermehrung im Hinterdarme — nach dem Vorderdarme und dem Kanale des Rüssels auswandert. 3. Endlich, eine Evolution von besonderer Art, welche sich an, der Form nach verschiedenen, Parasiten vollzieht, die den inneren Wänden des Rüssels anhaften. Bei letzterem Modus vermutet der Autor das Vorkommen von Autogamie, analog mit derjenigen, die bei Amoeben und anderen Protozoen beschrieben ist; doch fand ich in den Beschreibungen keinen überzeugenden Nachweis desselben.

Roubaud sieht in der gewöhnlichen Vermehrung der Trypanosomen, die im Darmkanal aller an infizierten Tieren ernährten Glossinen gefunden wurde, eine Kultur des Parasiten, welche mit derjenigen übereinstimmt, welche man auf Blut-Agar erhält. Dabei ist es von Interesse, die Resultate zu vergleichen, die man bei verschiedenen Arten von *Trypanosoma* (*brucei — gambiense — dimorphon — congolense — cazalboui* etc.) erhält; man konstatiert dabei, dass die Zeit der Permanenz im Darmkanale der Fliegen bei den verschiedenen Arten sehr variirt, indem einige daselbst nur kurze Zeit leben, während andere volle Aktivität und Vermehrung zeigen, bis die Reste des verdauten Blutes verschwinden. Aus lange dauernden Untersuchungen schliesst Roubaud auf das Fehlen einer Migration der Kulturformen vom Mitteldarme nach dem Vorderdarme und dem Rüssel; ebensowenig sollen sie nach der Leibeshöhle oder einem anderen Organ der Glossinen wandern. Demgemäss wären es Formen, welche nicht durch den Stich auf Wirbeltiere verimpft werden können. Die Bilder dieser Flagellaten gleichen keineswegs denjenigen in den Kulturen von *Trypanosoma lewisi,* indem hier die Crithidiaform nicht gefunden wird. Dieses Verhältniss ist nach der Meinung des Autors den krankheitserzeugenden Trypanosomen eigentümlich.

Nach Rekapitulierung dieser Versuche, zum Zweck der Vergleichung derselben mit meinen Ergebnissen, muss ich noch einige abweichende Meinungen erwähnen, besonders die-

objeção, uma vez que fôram praticadas no laboratorio em larvas aí nacidas.

Temos, em nossas experiencias, diversos rezultados pozitivos de transmissão do *Schizotrypanum cruzi* pelo conorrino, larva ou adulto, 10 ou mais dias depois da injestão contaminante. O prazo minimo, até agóra verificado, para que o inséto se torne infetante, é de 10 dias; quanto ao tempo de duração do poder infeciozo não o avaliámos ainda, sendo todavia longo, confórme rezulta de algumas experiencias. Fica, dest'arte, excluido o papel mecanico excluzivo do hemiptero, e mesmo que esse possa atuar como simples veículador na transmissão imediata do parazito, o que nunca verificámos, a função principal será de hospedeiro intermediario, no qual o flajelado passa por ciclo evolutivo, que se completa no prazo minimo de 10 dias.

No *Conorhinus*, o *Schizotrypanum cruzi* aprezenta duas modalidades evolutivas bem distintas: uma dellas é constante e se observa sempre que o inséto suga vertebrado infetado, qualquer que seja. Desta o ultimo estádio é o de parazitos, com tipo de critidias, do intestino médio. As fórmas aqui encontradas são inteiramente analogas ás das culturas artificiais e as larvas, apezar de aprezentarem os parazitos no intestino, não são infetantes para outros vertebrados. Pensámos ser esse um dezenvolvimento identico ao das culturas em agar-sangue, não tendo elle nenhuma importancia na transmissão do *Schizotrypanum*. Cazo analogo é o referido nos trabalhos de ROUBAUD; no nosso cazo porém, devido ás condições anatomo-fiziolojicas especiais, os detritos da dijestão do sangue permanecem por muitos dias no intestino do conorrino sendo, por isso, longa a permanencia dos flajelados.

Não seria talvez inaceitavel a hipoteze de que esse dezenvolvimento reprezenta a multiplicação das fórmas indiferentes, admitindo com SCHAUDINN, a existencia dellas; ou será a multiplicação de fórmas femeas não fecundadas.

Verificámos muitas vezes, a auzencia de migração dos flajelados, do intestino médio

jenigen von NOVY und MAC NEAL, BREINL und MOORE, PATTON und die von ROSS.

NOVY und MAC NEAL traten den Arbeiten von SCHAUDINN über *Haemoproteus* entgegen, indem sie zuerst glaubten, dass es sich nur um die Kultur eins Trypanosoma der *Athene noctuae* in den Mücken handle; später nach vielfach wiederholtem Auffinden von Flagellaten bei blutsaugenden und anderen Insekten — glaubten diese Forscher die Flagellatenformen von SCHAUDINN als natürliche Parasiten der Mücke — ohne irgendwelche Beziehung zu den Blutparasiten des Kauzes — auffassen zu dürfen.

In einer solchen natürlichen Infektion blutsaugender Insekten durch Arten von *Crithidia* und *Herpetomonas* suchen NOVY und MAC NEAL die Ursache der Irrtümer, in welche ihrer Meinung nach andere Forscher verfielen, wenn sie die Entwicklung von Wirbeltiertrypanosomen im Organismus von Insekten beschrieben.

BREINL und MOORE glauben, dass der vollständige Entwicklungskreis eines Trypanosomas im Organismus der Wirbeltiere stattfindet. Sie stützen ihre Meinung auf das Vorkommen von Widerstandsformen in den Organen der infizierten Tiere; das Auftreten derselben sei die Folge einer Einwirkung des Blepharoplasten auf den Hauptkern (Autogamie). Sie erinnern an den Fall der Dourine, bei welcher die Trypanosomen durch Coitus übertragen werden, um zu beweisen, dass im Entwicklungskreise der Trypanosomen eine sexuelle Phase im Innern des Ueberträgers entbehrlich ist.

PATTON, der vielfache Beiträge zur Kenntnis der Flagellaten aus dem Darme von Insekten geliefert hat, glaubt, dass letztere bei der Uebertragung der Wirbeltiertrypanosomen die Rolle bloss mechanischer Ueberträger spielen. Dieselbe Meinung hat ROSS, welcher bei Larven und Nymphen von Culiciden Flagellaten des Genus *Crithidia* fand.

Ich komme nun zu den Schlüssen aus meinen eigenen Untersuchungen: Da ich mit Larven arbeitete, die im Laboratorium gezüchtet waren, auch eine erbliche Uebertragung der Flagellaten ausgeschlossen hatte, so ent-

para as partes anteriores do tubo dijestivo do inséto, examinando, logo apoz as refeições do *Conorhinus,* o conteúdo do intestino anterior. Aí não são encontradas, nesse momento, fórmas de critidias o que deveria acontecer si a infeção do vertebrado fosse determinada pela acensão, no ato da picada, dos flajelados do intestino médio até a tromba.

De acôrdo com esses fatos, os estádios de critidias, no *Conorhinus,* nenhuma significação tem para a infeção do vertebrado; reprezentam talvez, um retrocesso á condição larvaria primitiva, devido ás influencias do meio, podendo ainda servir, cazo haja infeção pelos excrementos, para manter a vida do protozoario nas gerações sucessivas de conorrinos.

Da outra modalidade de evolução, que reprezenta, a nosso vêr, o verdadeiro ciclo evolutivo do flajelado, eficaz na transferencia delle entre vertebrados, surpreendemos 4 estádios diversos: 2 no intestino anterior, reprezentados pelos organismos da Est. 12, Fig. 78-82 e pela fórma esquizogonica da Est. 12, Fig. 89, 1 na cavidade geral e o ultimo nas glandulas salivares.

Não conhecemos o determinismo do aparecimento destas fórmas; nossas experiencias, porém, mostram serem as duas primeiras observadas, com frequencia, nas larvas alimentadas em *Callithrix,* inicialmente infetados pelo hemiptero, ao passo que não conseguimos obtel-as quando experimentando com larvas infetadas em cobaias. Por outro lado, nas tentativas de transmissão pelas picadas do inséto, verificámos fatos similares, isto é, o poder infetante das larvas contaminadas nos *Callithrix* e a auzencia delle nas nutridas em cobaias, cuja infeção era produzida por inoculação de sangue.

Raciocinando sobre esses rezultados, somos levado a admitir uma condição especial do flajelado, da qual dependeria a ocurrencia do ciclo evolutivo sexuado, no organismo do inséto trsnsmissor. Para o *Schizotrypanum cruzi* aquella condição seria realizada no *Callithrix penicillata* e provavelmente no homem,

gehen meine Resultate dem Einwurfe, dass es sich um natürlich bei Hemipteren vorkommende Flagellaten handle. Ausserdem wurden andere Larven zur Kontrolle an gesunden Tieren ernährt, wobei immer die Parasiten fehlten.

Kontrollexperimente waren geboten, besonders, weil ich Flagellaten im Mitteldarme fast aller in Wohnungen gefangener Conorhinen fand, was dazu verleiten könnte, sie für natürliche Parasiten des Insektes anzusehen. In der Tat kann ich zur Zeit diese Frage nicht entscheiden, da es möglich ist, dass die Conorhinen, welche das *Schizotrypanum cruzi* übertragen, natürlich mit Flagellaten des Genus *Leptomonas (Crithidia)* infiziert sind. Zur Erklärung der Infektion sämtlicher Conorhinen durch Flagellaten — vorausgesetzt, dass diese Entwicklungsformen des *Schizotrypanum* darstellen — wäre es nötig, einen anderen Infektionsmodus bei den Wanzen anzunehmen, z. B. die Infektion der Larven durch die Exkremente bereits infizierter Individuen (Lutz). Es ist nämlich kaum anzunehmen, dass das Stechen infizierter Wirbeltiere mit solcher Regelmässigkeit die Infektion der Conorhinen herbeiführen würde. Allerdings existiert kein Unterschied zwischen den Parasiten aus dem Darme im Laboratorium infizierter Larven und solcher von Conorhinen, die in menschlichen Wohnungen gefangen wurden. Andererseits ergab mir die Einimpfung von Material aus dem Darme experimentell infizierter Larven auf Meerschweinchen, neben einigen negativen, verschiedene positive Ergebnisse und dasselbe geschah bei Flagellaten aus dem Darme frisch gefangener Wanzen. Obwohl ich nun meine Untersuchungen wiederholen muss, um die Natur der Flagellaten aus dem Darme freilebender Conorhinen vollständig aufzuklären, so sind doch meine Beobachtungen über die Entwicklung des *Schizotrypanum* vollständig einwandsfrei, da sie mit im Laboratorium gezüchteten Larven angestellt wurden.

Ich erhielt bei meinen Versuchen über die Uebertragung des *Schizotrypanum cruzi* durch *Conorhinus* im erwachsenen oder Larven-Zustande verschiedene positive Resultate ~~zehn~~ 9

sendo estes os hospedeiros capazes de infetar conorrinos que se tornariam infetantes. Devemos aqui referir as nossas ultimas observações a respeito da morfolojia do parazito no organismo das cobaias. Nas primeiras investigações realizadas em *Callithrix* e cobaias, era constante e muito evidente o dimorfismo do flajelado, confórme referimos e vem demonstrado em nossos dezenhos; actualmente, porém, talvez devido a repetidas passajens pelo organismo de cobaias, os parazitos se aprezentam, quazi sempre, com um unico aspéto morfico, não havendo agóra a primitiva evidencia do dimorfismo.

Como explicar essa mudança na morfolojia do parazito? Será uma adaptação lenta ao organismo da cobaia, rezultando daí a predominancia de uma fórma do esquizotripano, que seria a indiferente?

Devemos voltar a novas observações sobre esse fato, para dizer delle com segurança.

A influencia de certa condição dos tripanozomos, no sangue dos vertebrados, sobre a infeção dos insétos, vem admitida nos rezultados das pesquizas de KOCH. Este verificou tornarem-se infetantes as glossinas que sugavam vertebrados com pequeno numero de parazitos, ao passo que outras, alimentadas em animais com abundancia de tripanozômos, não adquiriam o poder transmissor. Assim, pois, nossa dedução, bazeada em diversas experiencias, incide na daquelle observador.

De grande importancia foi a nossa verificação de parazitos na cavidade geral e nas glandulas salivares do conorrino. Retiravamos o liquido da cavidade, amputando as pernas ou pela punção, com tubos capilares, do abdome, não podendo sofrer duvida a observação. Os insétos que aprezentavam fórmas parazitarias na cavidade geral mostraram, no intestino médio, fórmas de critidias, aí não sendo visto nenhum parazito com blefaroplasto posterior ao nucleo principal. Quanto aos flajelados das glandulas salivares, aprezentam aspéto morfolojico muito especial, diverso do verificado em todos os outros estádios da evolução. Nenhuma duvida temos que sejam aquellas as fórmas infetantes dos

oder mehr Tage nach der infektiösen Blutaufnahme. Bis jetzt sind 10 Tage der kürzeste Termin, der nach meinen Feststellungen nötig war, um dem Ueberträger die Eigenschaft der Infektiosität zu verleihen; wie lange letztere anhält, kann ich noch nicht angeben, doch beweisen mehrere Versuche eine lange Dauer derselben.

Auf diese Weise wird bei Conorhinus die Rolle des mechanischen Ueberträgers ausgeschlossen; wenn derselbe auch als einfacher Träger des Virus funktionieren könnte, was ich niemals beobachtete, so bliebe doch seine Hauptrolle diejenige des Zwischenwirtes, in welchem der Flagellat einen Entwicklungskreis durchmacht, zu dessen Vollendung ein Minimum von 10 Tagen nötig ist. Das *Schizotrypanum cruzi* zeigt beim *Conorhinus* zwei deutlich verschiedene Arten der Entwicklung; eine derselben ist konstant und wird immer beobachtet, wenn das Insekt ein infiziertes Wirbeltier beliebiger Art sticht; ihr letztes Stadium besteht in Parasiten des Mitteldarms von *Leptomonas*-typus (*Crithidia*). Die hier gefundenen Formen stimmen vollständig mit solchen aus künstlichen Kulturen überein und die Larven sind für andere Wirbeltiere nicht infektiös, obwohl sie Parasiten im Darme aufweisen. Ich halte diese Entwicklungsart für gleichwertig mit derjenigen der Blut-Agar-Kulturen und ohne Bedeutung für die Uebertragung des *Schizotrypanum*. Es ist dies ein analoger Fall mit dem oben von ROUBAUD berichteten, jedoch bleiben, wegen besonderer anatomischer und physiologischer Bedingungen, die Residuen der Blutverdauung längere Zeit im Darme des *Conorhinus*, was die lange Permanenz der Flagellaten erklärt.

Wie mir scheint, ist die Hypothese nicht ohne weiteres abzulehnen, dass diese Entwicklungsart eine Vermehrung der indifferenten Formen darstellt (wenn man mit SCHAUDINN das Vorkommen solcher annimmt); es kann sich aber auch um eine Vermehrung unbefruchteter weiblicher Formen handeln.

Das Fehlen einer Ueberwanderung der Flagellaten aus dem Mitteldarme nach den mehr nach vorne gelegenen Partien des Darmkanales habe ich oftmals festgestellt, indem

vertebrados; julgámos, porém, necessario praticar novas pesquizas para melhor esclarecimento desta faze.

O outro ponto, sobre o qual devemos insistir, é a natureza da divizão nuclear nos tripanozômos. BREINL e MOORE, uzando aliaz processos seguros de fixação e de coloração, julgam que a divizão do nucleo principal dos tripanozomos é amitozica, nunca tendo verificado os aspétos de mitoze referidos por V. PROWAZEK.

Estudando a multiplicação do parazito, no intestino do conorrino, tivémos oportunidade de referir fazes de mitoze bem evidentes. Posteriormente, no sangue periférico de uma cobaia, observámos uma figura de mitoze do nucleo principal, que rezolve, pela sua clareza, definitivamente a questão. (Est. 12, Fig. 88). Aí se observam duas placas secundarias (placas filhas) de cromozomios, situadas sobre o fuzo de substancia acromatica; no centro deste é vizivel o filamento central, em cujas extremidades se encontram os dois centriolos. Trata-se ainda, nesse cazo, de divizão precoce do nucleo, precedendo a esquizogonia no pulmão.

Rezumindo:

1.º O *Schizotrypanum cruzi* aprezenta, no organismo do conorrino, duas modalidades de dezenvolvimento, reprezentando a primeira simples cultura do parazito; a outra, provavelmente precedida de fenomenos sexuais não surpreendidos, será, talvez, o ciclo evolutivo, eficaz na transmissão entre os vertebrados.

2.º O *Conorhinus* é um verdadeiro hospede intermediario do *Schizotrypanum*, cujo ciclo é realizado num prazo minimo de 10 dias.

3.º Os flajelados, com tipo de critidias encontrados nos conorrinos em liberdade, podem reprezentar estádios culturais do *Schizotrypanum* ou serão parazitos exclusivos do inséto.

4.º A ocurrencia do ciclo evolutivo sexuado, no organismo do conorrino, depende de condição, não explicada, dos flajelados no sangue dos vertebrados.

ich bei den Conorhinen kurz nach der Nahrungsaufnahme den Vorderdarminhalt untersuchte. Man findet hier zu solcher Zeit keine *Crithidien*-formen, wie es sein müsste, wenn die Ansteckung der Wirbeltiere beim Stiche durch das Aufsteigen der Flagellaten aus dem Mitteldarme nach dem Rüssel stattfände.

In Uebereinstimmung mit diesen Tatsachen haben die *Crithidien*-stadien im Conorhinus keine Bedeutung für die Infektion des Wirbeltieres; vielleicht repräsentieren sie ein Zurückkehren zu einem phylogenetisch ursprünglichen Zustande als Folge der Einflüsse des Mediums; dabei könnten sie, wenn es eine Infektion durch Exkremente gibt, dazu dienen, das Leben der Protozoen auch in auf einander folgenden Generationen von Conorhinen zu erhalten.

Die andere Entwicklungsart vertritt meines Erachtens den eigentlichen Entwicklungszyklus des Parasiten, der bei seiner Uebertragung auf Wirbeltiere zur Geltung kommt; ich habe von demselben vier verschiedene Stadien angetroffen: zwei im Vorderdarm, nämlich die runden Formen (Taf. 12, Fig. 78—82), und die Schizogonieform (Taf. 12, Fig. 89), ferner eine aus der Körperhöhle und die letzte aus den Speicheldrüsen.

Die veranlassenden Umstände des Auftretens dieser Formen kenne ich noch nicht, doch zeigen meine Versuche die Häufigkeit des Vorkommens der beiden ersten bei Larven, welche an — ursprünglich durch Wanzen infizierten — *Callithrix*-affen gefüttert wurden. Dagegen konnte ich sie nicht erhalten, wenn ich mit an Meerschweinchen infizierten Larven experimentierte. Andererseits beobachtete ich ähnliche Verhältnisse bei Versuchen durch den Stich der Conorhinen, nämlich die Infektiosität der Larven, welche durch die Aeffchen infiziert waren und das Fehlen einer solchen bei Larven, welche an — durch Blutinjektion infizierten — Meerschweinchen genährt wurden.

Beim Ueberlegen dieser Ergebnisse sehe ich mich veranlasst, einen besonderen Zustand der Flagellaten anzunehmen, von dem das Auftreten eines geschlechtlichen Entwicklungszyklus im Organismus des Ueberträgers ab-

Ao terminar, cumprimos o grato dever de afirmar o maior reconhecimento ao nosso mestre e Diretor Dr. GONÇALVES CRUZ, a cuja orientação devemos o rezultado destas pesquizas. Somos ainda profundamente grato aos nossos mestres, Professores S. VON PROWAZEK e M. HARTMANN, de quem recebemos os melhores ensinamentos para concluzão deste trabalho. Tambem somos em extremo obrigado ao Dr. ADOLPHO LUTZ, cujo auxilio nos foi do mais alto proveito.

Tivemos sempre, como esforçado companheiro de trabalho na zona infestada pela nova especie morbida, o Dr. BELISARIO PENNA, a quem devemos os inestimaveis proveitos de um auxilio eficaz.

hängt. Für das *Schizotrypanum cruzi* fände sich dieser Zustand bei *Callithrix penicillata* und wahrscheinlich beim Menschen; sind doch diese die Wirte, welche die Conorhinen infektiös machen können.

Hier muss ich auch meine letzten Beobachtungen über die Morphologie des Parasiten im Organismus der Meerschweinchen anführen. Bei den ersten Untersuchungen, welche an *Callithrix* und Meerschweinchen vorgenommen wurden, war der Dimorphismus der Flagellaten konstant und in die Augen springend, wie aus meiner Darstellung und den Zeichnungen hervorgeht; heute dagegen — vielleicht als Folge wiederholter Meerschweinchenpassagen — zeigen die Parasiten fast immer eine einzige Form, ohne den ursprünglichen auffälligen Dimorphismus. Wie erklärt sich diese Veränderung in der Morphologie des Parasiten? Ist es eine langsame Anpassung an den Meerschweinchenorganismus, durch welche das Vorwiegen einer Form des *Schizotrypanum*, nämlich der indifferenten, zustandekommt? Um dies mit Sicherheit zu beantworten muss ich meine Beobachtungen in Hinsicht auf diese Frage wieder aufnehmen.

Der Einfluss eines bestimmten Zustandes der Trypanosomen im Blute der Wirbeltiere auf die Infektion der Insekten wird in den Resultaten der Forschungen von KOCH zugegeben. Derselbe stellte fest, dass Glossinen infektiös wurden, wenn sie Blut von Wirbeltieren mit wenig Parasiten sogen, während andere, die an Tieren mit grosser Parasitenzahl ernährt wurden, die Uebertragungsfähigkeit nicht erwarben. So stimmt meine auf andere Experimente basierte Schlussfolgerung mit der jenes Forschers überein.

Sehr wichtig war die Feststellung des Vorkommens von Parasiten in den Speicheldrüsen und dem Lacunom der Conorhinen. Ich entnahm die Flüssigkeit des letzteren durch Abschneiden der Beine oder Punktion des Abdomens mittelst Capillaren, sodass die Beobachtung einwandfrei ist. Die Wanzen, welche Parasiten des Lacunoms zeigten, boten im Mitteldarm nur *Crithidien*-formen, bei Fehlen vom Parasiten mit hinter dem Haupt-

kern liegendem Blepharoplasten. Die Flagellaten der Speicheldrüsen geben ein ganz besonderes morphologisches Bild, welches sich von allen anderen Entwicklungsstadien unterscheidet. Es ist für mich zweifellos, dass dies die für Wirbeltiere infektiösen Formen sind; doch glaube ich, dass zur vollständigen Aufklärung dieser Phase noch weitere Untersuchungen nötig sind.

Ein anderer Punkt, auf den ich eingehen muss, ist die Art der Kernteilung bei den Trypanosomen. BREINL und MOORE, welche im Uebrigen eine zuverlässige Färbungs- und Fixierungstechnik gebrauchten, glauben, dass die Teilung des Hauptkernes bei den Trypanosomen amitotisch sei, da sie niemals die von v. PROWAZEK angegebenen Mitosebilder feststellen konnten. Beim Studium der Vermehrung des Parasiten im Darme des Conorhinus hatte ich Gelegenheit, sehr deutliche Mitosestadien zu erkennen. Später beobachtete ich im peripherischen Blute eine Mitosefigur des Hauptkernes, welche durch ihre Deutlichkeit die Frage definitiv entscheidet (Taf. 12, Fig. 88). Man bemerkt bei derselben zwei sekundäre Platten von Chromosomen (Tochterplatten), welche auf einer achromatischen Spindel liegen; im Zentrum derselben erblickt man den Zentralfaden, an dessen Enden die zwei Centriolen sichtbar sind. Es handelt sich auch in diesem Falle um eine frühzeitige Mitose des Kernes, welche der Schizogonie in der Lunge vorausgeht.

Wenn ich noch einmal resummiere, so zeigt:

1. Das *Schizotrypanum cruzi* im Organismus des *Conorhinus* zwei Arten der Entwicklung, von denen die erste eine einfache Kultur des Parasiten darstellt, während die andere — wahrscheinlich durch nicht beobachtete sexuelle Vorgänge eingeleitete — vielleicht den richtigen Entwicklungszyklus zeigt, welcher bei der Uebertragung von Wirbeltier zu Wirbeltier in Tätigkeit tritt.
2. Ist der *Conorhinus* der eigentliche Zwischenwirt des *Schizotrypanum cruzi*, dessen Entwicklungskreis in einer Periode von 10 Tagen (im Minimum) abläuft.
3. Können die Flagellaten von *Crithidien*-typus, welche in freilebenden Conorhinen vorkommen, Kulturstadien des *Schizotrypanum* darstellen oder ausschliessliche Insektenparasiten sein.
4. Hängt das Auftreten des sexuellen Entwicklungszyklus im Organismus der Conorhinen von noch unaufgeklärten Zuständen der Flagellaten im Blute der Wirbeltiere ab.

Zum Schlusse erfülle ich die angenehme Pflicht, unserem Direktor, Herrn Dr. GONÇALVES CRUZ meinen besten Dank auszusprechen. Seiner Leitung verdanke ich die Resultate meiner Untersuchungen.

Auch meinen Lehrern, den Herren Dr. S. von PROWAZEK und Dr. M. HARTMANN, von denen ich bei Vollendung dieser Arbeit vielfache Belehrung erhielt, bin ich sehr dankbar. Auch Herrn Dr. ADOLPH LUTZ, dessen Hilfe mir von grösstem Nutzen war, bin ich bestens verpflichtet.

In der Zone in welcher die neue Krankheitsform herrscht hatte ich beständig als Mitarbeiter Dr. BELISARIO PENNA, dem ich für seine unschätzbare Unterstützung meiner Nachforschungen verpflichtet bin.

ESTAMPA 9

Fig. 1. *Conorhinus megistus* BURM. transmissor de *Schizotrypanum cruzi.*
Fig. 2. Cabeça do *Conorhinus,* vista de perfil, mostrando a tromba sugadora.
Fig. 3. Ultimo segmento abdominal do ♂.
Fig. 4. Item da ♀.

Nota — Os traços entre os dezenhos 3-4 dão os tamanhos naturais dos insétos ♂ e ♀

TAFEL 9

Fig. 1. *Conorhinus megistus.* BURM. Ueberträger des *Schizotrypanum cruzi.*
Fig. 2. Kopf des *Conorhinus,* im Profil, den Saugrüssel zeigend.
Fig. 3. Letztes Abdominalsegment des ♂.
Fig. 4. Dasselbe des ♀.

Anmerkung — Die Striche zwischen den Zeichnungen 3 und 4 geben die natürliche Grösse beider Geschlechter an.

ESTAMPA 9.

Fig. 1. Conorhinus megistus Burm. transmissor de Schizotrypanum cruzi.
Fig. 2. Cabeça do Conorhinus, vista de perfil, mostrando a tromba sugadora.
Fig. 3. Ultimo segmento abdominal do ♂.
Fig. 4. Item da ♀.

Nota — Os traços entre os decenhos 3-4 dão os tamanhos naturais dos insetos ♂ e ♀

TAFEL 9

Fig. 1. Conorhinus megistus Burm. Ueberträger des Schizotrypanum cruzi.
Fig. 2. Kopf des Conorhinus, im Profil, den Saugrüssel zeigend
Fig. 3. Letztes Abdominalsegment des ♂.
Fig. 4. Dasselbe des ♀.

Anmerkung - Die Striche zwischen den Zeichnungen 3 und 4 geben die natürliche Grösse beider Geschlechter an.

2

1

3

♂

♀

4

CASTRO SILVA
ad. nat. del.

ESTAMPA 10

Fig. 1-3. Merozoitos nos globulos vermelhos.
Fig. 4. Merozoitos, mostrando a formação do blefaroplasto.
Fig. 5. Parazito totalmente incluido na hemátia, sem flajelo e membrana ondulante.
Fig. 6-19. Parazitos parcialmente incluidos.
Fig. 20. Parazito femeo livre no plasma.
Fig. 21. Parazito macho livre no plasma.
Fig. 22-24. Parazitos novos livres no plasma.
Fig. 25-26. Flajelados adultos no *Callithrix* inoculado com sangue humano.
Fig. 27-28. Parazitos do sangue humano.
Fig. 29-36. Parazitos no pulmão do vertebrado, em preparo para a esquizogonia.

TAFEL 10

Fig. 1-3. Merozoiten in den roten Blutkörperchen.
Fig. 4. Merozoit die Bildung des Blepharoplasten zeigend.
Fig. 5. Vollständig im Blutkörperchen eingeschlossener Parasit, ohne Geissel und undulierende Membran.
Fig. 6-19. Teilweise eingeschlossene Parasiten.
Fig. 20. Weiblicher Parasit, frei im Plasma.
Fig. 21. Männlicher Parasit, frei im Plasma.
Fig. 22-24. Junge Parasiten, frei im Plasma.
Fig. 25-26. Erwachsene Parasiten der *Callithrix*, nach Impfung mit menschlichem Blute.
Fig. 27-28. Parasiten aus dem menschlichen Blute.
Fig. 29-36. Parasiten aus der Lunge von Wirbeltieren in Vorbereitung für die Schizogonie.

LÁMINA 10

Fig. 1-3. Microorganismos ovalados vermelhos.

Fig. 4. Microorganismos, preparando a formação de bolinhas.

Fig. 5. Microorganismos incluindo no hialoplasma.

Figs. 6-10. Diversos parasitismos mistos.

Fig. 11. Parasito todo livre no plasma.

Fig. 12. Parasito todo livre no plasma.

Figs. 13-18. Microorganismos livres no plasma.

Fig. 19-20. Hialoplasma aduncos no Citoplasma incorporado com sangue humano.

Fig. 21-26. Parasitos do sangue humano.

Fig. 29-34. Parasitos no pulmão do verde-biado, com processo para a esquizogonia.

TAFEL 10

Fig. 1-3. Mikroorganismen in den roten Blutkörperchen.

Fig. 4. Mikroorganismen die Bildung des Diaphragmas zeigend.

Fig. 5. Vollständig im Blutkörperchen eingeschlossener Parasit, ohne Geisel und Membran.

Figs. 6-10. Verschiedene eingeschlossene Parasiten.

Fig. 11. Vollständig freier im Plasma.

Fig. 12. Vollständig freier im Plasma.

Figs. 13-18. Mikroorganismen frei im Plasma.

Fig. 19. Gekrümmter Parasit, frei im Plasma.

Fig. 20. Gekrümmter Parasit, frei im Plasma.

Fig. 21. Mikroorganismen Parasiten, frei im Plasma.

Fig. 22-24. Junge Parasiten, frei im Plasma.

Fig. 25-26. Erwachsene Parasiten der Cuffi-Blute.

Figs. 27-28. Parasiten aus dem menschlichen Blute.

Fig. 29-36. Parasiten aus der Lunge von Wirbeltieren in Vorbereitung für die Schizogonie.

CASTRO SILVA

ESTAMPA 11

Fig. 37-39. Fórmas iniciais da esquizogonia.
Fig. 40-46. Fórmas esquizogonicas no pulmão do vertebrado.
Fig. 47-60. Fórmas iniciais no intestino médio do *Conorhinus*.
Fig. 61-70. Fórmas de flajelados do intestino posterior do *Conorhinus*.
Fig. 71-73. Fórmas da cavidade geral do inséto.
Fig. 74-75. Fórmas das glandulas salivares.

TAFEL 11

Fig. 37-39. Anfangsformen der Schizogonie.
Fig. 40-46. Schizogonieformen aus der Lunge von Wirbeltieren.
Fig. 47-60. Initialformen aus dem Mitteldarme von *Conorhinus*.
Fig. 61-70. Flagellaten aus dem Enddarme des *Conorhinus*.
Fig. 71-73. Formen aus der Leibeshöhle des Insektes.
Fig. 74-75. Formen aus den Speicheldrüsen.

ESTAMPA II

Fig. 77-79. Formas juvenis da espécie-tipo (...).
Fig. 80-86. Formas espinulosas (...) (...)
mão do verticilado.
Fig. 87-90. Formas juvenis do pulmão (...)
dio do Cercopithecus
Fig. 91-96. Formas de ligamos do intes-
tino posterior do Cercopithecus.
Fig. 97-98. Formas da variedade geral do
intestino.
Fig. 99-103. Formas das glandulas salivares.

TAFEL II

Fig. 77-79. Junge Formen der Echinogone.
Fig. 80-86. Spinulose Formen (...) (...)
des von Wirbeltieren.
Fig. 87-90. Jugendformen aus dem Mund-
raume von Cercopithecus
Fig. 91-96. Blasenförmige Anhänge (...)
des Darmes.
Fig. 97-98. Formen aus der Variabilität
Fig. 99-103. Formen aus den Speicheldrüsen.

CASTRO SILVA

ESTAMPA 12

Fig. 76-77. Fórmas das glandulas salivares.
Fig. 78-82. Fórmas não interpretadas do intestino médio (zigotos?).
Fig. 83-86. Mitoze do nucleo e do blefaroplasto no intestino médio.
Fig. 87. Formação do flajelo. Fórma do intestino posterior do *Conorhinus*.
Fig. 88. *Schizotrypanum* no sangue. Mitoze do nucleo.
Fig. 89-97. Fórmas encontradas no intestino médio.
Fig. 98-109. Fórmas de culturas no meio NOVY e MC. NEAL.

Os dezenhos das estampas 10-11-12 foram feitos com Oc. 5. Obj. $^1/_{12}$ im. homoj. Z. de preparados fixados pelo alcool absoluto e coloridos pelo processo de GIEMSA.

TAFEL 12

Fig. 76-77. Formen aus den Speicheldrüsen.
Fig. 78-82. Unbestimmte Formen aus dem Mitteldarme (Zygoten?).
Fig. 83-86. Mitose von Nucleus und Blepharoplast im Mitteldarme des *Conorhinus*.
Fig. 87. Bildung der Geissel. Formen aus dem Hinterdarme des *Conorhinus*.
Fig. 88. *Schizotrypanum* im Blute. Kernmitose.
Fig. 89-97. Formen aus dem Mitteldarme.
Fig. 98-109. Formen aus den Culturen nach NOVY und MC. NEAL.

Die Zeichnungen der Tafeln 10-11-12 sind mit Oc. 5. Obj. $^1/_{12}$ Oelimm Z. nach mit absolutem Alkohol fixierten und nach GIEMSA gefärbten Präparaten gezeichnet.

ESTAMPA 12

Fig. 70-77. Fórmas das glandulas salivares.

Fig. 78-82. Fórmas nas interpreanas do intestino medio (*Trypanosoma* ?).

Fig. 83-86. Mitose do nucleo e do blefaroplasto no intestino medio.

Fig. 87. Formação do diapelo. Fórma do intestino posterior do *Cimicidæ*.

Fig. 88. *Schizotrypanum* no sangue. *Mitose* do nucleo.

Fig. 89-97. Fórmas encontradas no intestino medio

Fig. 98-109. Fórmas de cultura no meio *N. n.* e *Mc. Neal*.

Os desenhos das estampas 10-11-12 foram feitos com Oc. 5. Obj. $\frac{1}{12}$ im. homoj. Z. de preparados fixados pelo alcool absoluto e colhidos pelo processo de Giemsa.

TAFEL 12

Fig. 70-77. Formen aus den Speicheldrüsen

Fig. 78-82. Intestinale Formen aus dem Mitteldarme (*Trypanosoma* ?).

Fig. 83-86. Mitosis von Nucleus und Blepharoplast im Mitteldarme aus *Cimicidæ*.

Fig. 87. Bildung der Cyste. Formen aus dem Hinterdarme der *Cimicidæ*.

Fig. 88. *Schizotrypanum* im Blute. Kernmitose.

Fig. 89-97. Formen aus dem Mitteldarme.

Fig. 98-109. Formen aus den Culturen nach *N. n.* und *Mc. Neal*.

Die Zeichnungen der Tafeln 10-11-12 sind mit Oc. 5. Obj. $\frac{1}{12}$ Oelimm. Z. nach vorher absoluten Alkohol fixierten und nach Giemsa gefärbten Präparaten gezeichnet.

76
77
78
79
80
81
82
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109

ESTAMPA 13

Preparados do *Schizotrypanum cruzi*. Fixação á humido pelo sublimado-alcool (SCHAUDINN). Coloração pela hematoxilina ferrea (ROSENBUSCH). Oc. compens. 18. Obj. imm. homoj. 2 mm. Apert. 1.30.

Fig. 1. *Schizotrypanum* no sangue do *Callithrix*. Divizão do cariozoma. Estrutura do blefaroplasto.
Fig. 2-4. Item. Fórmas machas.
Fig. 5-8. Fórmas femeas no sangue de cobaia. Divizão do nucleo.
Fig. 9-11-12. Fórmas do intestino médio do *Conorhinus*. Formação do flajelo.
Fig. 10. Item. Mitoze terminal do nucleo e do blefaroplasto.
Fig. 13-20. Fórmas do intestino posterior do *Conorhinus*. Estrutura nuclear do blefaroplasto. Centriolo. Corpusculo bazal.
Fig. 21-22. Fórmas do intestino médio de larva de *Conorhinus*, 21 hóras apoz ter sugado animal infetado.
Fig. 23. Fórmas de cultura em meio NOVY-MC. NEAL.
Fig. 23a-24. Primeiras modificações do *Schizotrypanum* nas culturas artificiais.
Fig. 25-29. Esquizogonia no pulmão:
Fig. 25. Merozoitos machos.
Fig. 26. Merozoitos femeos.

TAFEL 13

Schizotrypanum cruzi. Die Präparate sind feucht mit Sublimatalkohol (SCHAUDINN) fixiert und mit Eisenhämatoxylin (nach ROSENBUSCH) gefärbt. Comp. oc. 18. Obj. Oelimm. 2 mm. Apert. 1.30.

Fig. 1. *Schizotrypanum* im Blute von *Callithrix*. Teilung des Caryosoms. Struktur des Blepharoplasts.
Fig. 2-4. Item. Männliche Formen.
Fig. 5-8. Weibliche Formen im Blute des Meerschweinchens in Kernteilung.
Fig. 9, 11, 12. Formen aus dem Mitteldarme des *Conorhinus*. Bildung der Geissel.
Fig. 10. Item. Endstadium der Mitose des Nucleus und Blepharoplasten.
Fig. 13-20. Formen aus dem Enddarme des *Conorhinus*. Kernstruktur des Blepharoplasten. Centriol. Basalkörperchen.
Fig. 21-22 — Formen aus dem Mitteldarme der *Conorhinus*larve, 21 Stunden nach Aufnahme von Blut eines inficierten Tieres.
Fig. 23. Formen aus Kulturen nach NOVY und MC-NEAL.
Fig. 23-24. Erste Veränderungen des *Schizotrypanum* in den Kulturen.
Fig. 25-29. Schizogonie. (Lunge):
Fig. 25. Männliche Merozoiten.
Fig. 26. Weibliche Merozoiten.

CASTRO SILVA
ad. nat. del.